



10/534742

Rec'd T/PTO 12 MAY 2005
Mod. C. 5-1-17

PCT/IB03/05092

Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

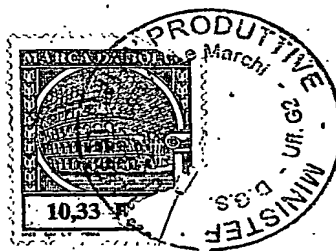
Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

Ufficio G2

REC'D 09 JAN 2004	
WIPO	PCT

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per: **Invenzione Industriale**

N. **BO2002 A 000714**



*Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali
depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati
risultano dall'accluso processo verbale di deposito.*

PCT/IB03/005092

22 DIC. 2003

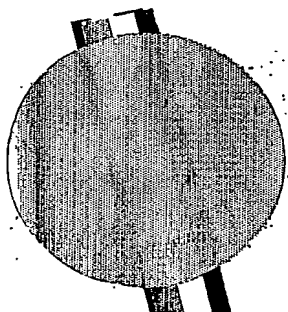
Roma, il

per IL DIRIGENTE
Paola Giuliano

Dr.ssa Paola Giuliano

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

BEST AVAILABLE COPY



AL MINISTERO DELL'INDUSTRIA DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI
DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITA' AL PUBBLICO

MODULO A

13 NOV 2002

A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione PLANTECHNO SRL (titolare 48%) SR
Residenza Vicomoscato (Cremona) codice 01080070194
2) Denominazione PROGEO Srl (titolare 35%) CN
Residenza Villa Masone (Reggio Emilia) codice 00127250355

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome nome avv. Trombetti Gioia cod. fiscale TRMGIO59P66E463E
denominazione studio di appartenenza _____
via Portazza n. 8 città Bologna cap 40139 (prov) BO

C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

via _____ n. _____ città _____ cap _____ (prov) _____

D. TITOLO

classe proposta (sez/cl/sci) _____

gruppo/sottogruppo ☐ / ☐

FARINE AD USO ALIMENTARE CON SPECIFICHE CARATTERISTICHE TECNOLOGICHE A BASSA ALLERGENICITA'

ANTICIPATA ACCESSIBILITA' AL PUBBLICO: SI ☐ NO ☒

SE ISTANZA: DATA ☐ / ☐ / ☐

N. PROTOCOLLO ☐

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

cognome nome

1) FOGHER CORRADO 3) _____
2) _____ 4) _____

F. PRIORITA'

Nazione o
organizzazione

Tipo di priorità

numero di domanda

data di deposito

allegato
S/R

SCIOGLIMENTO RISERVE

Data N° Protocollo

1) _____ ☐ / ☐ / ☐ ☐ _____
2) _____ ☐ / ☐ / ☐ ☐ _____

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICRORGANISMI, denominazione

H. ANNOTAZIONI SPECIALI

001: I titolari partecipano ai diritti sul brevetto nelle seguenti misure ex art.19 R.D. 1127/39

PLANTECHNO Srl 48%

PROGEO Srl 35%

TECNOALIMENTI Scpa 17%

DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.

Doc. 1) ☒ PROV ☐ n. pag 17 riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni
Doc. 2) ☒ PROV ☐ n. tav 31 (obbligatorio 1 esemplare)
Doc. 3) ☒ RIS ☐ disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare)
Doc. 4) ☐ RIS ☐ lettera d'incarico, procura o riferimento procura genera
Doc. 5) ☐ RIS ☐ designazione inventore
Doc. 6) ☐ RIS ☐ documenti di priorità con traduzione in italiano
Doc. 7) ☐ RIS ☐ autorizzazione o atto di cessione
Doc. 8) ☐ nominativo completo del richiedente

8) attestati di versamento, totale Euro 291,80

SCIOGLIMENTO RISERVE

Data N° protocollo

Confronta singole priorità

obbligatorio

COMPILATO IL 13 / 11 / 2002 FIRMA DEL (I) RICHIEDENTE (I)

avv. Trombetti Gioia, mandatario delle società richiedenti

CONTINUA (SI/NO) ☒

DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA (SI/NO) ☒

CAMERA DI COMMERCIO INDUSTRIA ARTIGIANATO AGRICOLTURA DI

BOLOGNA

codice 37

VERBALE DI DEPOSITO NUMERO DI DOMANDA

B02002A 000714

Reg. A

L'anno DUEMILADUE, il giorno

TREDICI

del mese di

NOVEMBRE

Il (I) richiedente (I) sopraindicato (I) ha (hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredata di n. 00 fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto soprariportato.

ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE

NESSUNA

IL DEPOSITANTE



UFFICIALE ROGANTE

[Signature]

FOGLIO AGGIUNTIVO n. di totali

DOMANDA N.

B02002A 000719

REG. A

AGGIUNTA MODULO A

N.B.

A. RICHIEDENTE (I)

☒ Q3 Denominazione TECNOALIMENTI SCpa (titolare 17%) ☒ CNResidenza Milano codice 13149660154 ☐ Denominazione Residenza codice ☐ Denominazione Residenza codice ☐ Denominazione Residenza codice ☐ Denominazione Residenza codice ☐ Denominazione Residenza codice

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

cognome nome

<input type="text"/>	<input type="text"/>
<input type="text"/>	<input type="text"/>
<input type="text"/>	<input type="text"/>
<input type="text"/>	<input type="text"/>
<input type="text"/>	<input type="text"/>
<input type="text"/>	<input type="text"/>
<input type="text"/>	<input type="text"/>
<input type="text"/>	<input type="text"/>
<input type="text"/>	<input type="text"/>
<input type="text"/>	<input type="text"/>

F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione

tipo di priorità

numero di domanda

data di deposito

allegato
S/R

<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

SCIOGLIMENTO RISERVE

Data

N° Protocollo

<input type="text"/>	<input type="text"/>
<input type="text"/>	<input type="text"/>
<input type="text"/>	<input type="text"/>
<input type="text"/>	<input type="text"/>
<input type="text"/>	<input type="text"/>
<input type="text"/>	<input type="text"/>

FIRMA DEL (I) RICHIEDENTE (I)

avv. Trombetti Gioia, mandatario delle società richiedenti

SPAZIO RISERVATO ALL'UFFICIO CENTRALE BREVETTI

RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE

NUMERO DOMANDA
NUMERO BREVETTO

D07002A 01.07.14

REG. A

DATA DI DEPOSITO 13 NOV 2002
DATA DI RILASCIO

RICHIEDENTE (I)

Denominazione

PLANTECHNO SRL

(titolare 48%)

Residenza

Vicomoscato (Cremona)

TITOLO

FARINE AD USO ALIMENTARE CON SPECIFICHE CARATTERISTICHE TECNOLOGICHE A BASSA ALLERGENICITA'

Classe proposta (sez./cl./scl/)

☐

(gruppo sottogruppo)

☐ / ☐

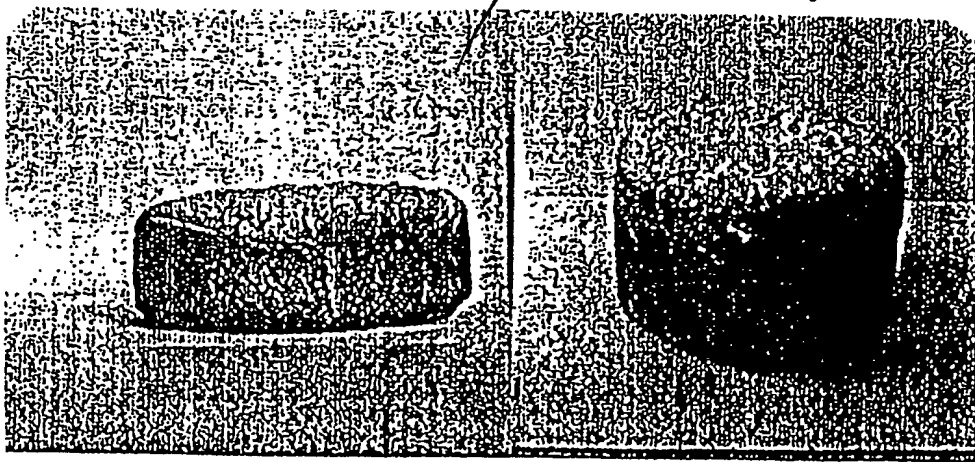
RIASSUNTO

Un nuovo cereale dal cui seme si ottengono farine ad uso alimentare per la produzione di prodotti da forno ottenuti da impianti delle farine alimentari e lievitati ottenuti da impasti di tali farine.

CAMERA DI COMMERCIO INDUSTRIA
ARTIGIANATO E AGRICOLTURA

Aw Trombetti Giola mandataria

M. DISEGNO

UFFICIO BREVETTI
IL FUNZIONARIO

#14.23

DESCRIZIONE annessa alla domanda di brevetto per invenzione industriale avente per titolo "FARINE AD USO ALIMENTARE CON SPECIFICHE CARATTERISTICHE TECNOLOGICHE E BASSA ALLERGENICITA'" depositata alla CCIAA di Bologna a nome delle società Plantechno Srl per il 48%, Progeo S.c.r.l per il 35% e Tecnoalimenti S.C.p.A per il 17%, a mezzo Mandatario Avvocato TROMBETTI Gioia con studio in Bologna 40139, in via Portazza 8.

Inventore Designato : FOGHER Corrado

CAMPO DELLA TECNICA

Il presente trovato si riferisce al campo della tecnica per la realizzazione di un nuovo cereale dal cui seme ottenere farine ad uso alimentare per la produzione di prodotti da forno ottenuti da impasti lievitanti delle farine alimentari ed ai lievitati ottenuti da impasti di tali farine. Come Classificazioni Internazionali di riferimento si indicano le classi: C12 n; A01 b .

STATO DELLA TECNICA

I prodotti da forno attualmente noti sono ottenuti quasi esclusivamente da farine di frumento. Tali farine infatti, per la proprietà lievitante del loro impasto con acqua e lievito, mantengono una struttura alveolare dopo la cottura in forno. Tale proprietà attribuisce alla farina di frumento, impastata opportunamente con acqua e lievito, di formare un impasto sufficientemente elastico per trattenere il gas che si produce nella fermentazione e di sviluppare una struttura soffice ed elastica dopo la cottura in forno. Responsabili di queste particolari proprietà tecnologiche sono le principali proteine di riserva dell'endosperma di frumento: le glutenine ad elevato e basso

peso molecolare. La loro particolare sequenza le rende infatti atte ad interagire per formare una complessa struttura tridimensionale capace di intrappolare l'anidride carbonica che si sviluppa nella fase di lievitazione ed assicurare al prodotto finito un volume specifico elevato.

Molte persone presentano allergie verso il glutine contenuto nelle farine di frumento, in particolare verso le componenti gliadiniche e gluteniniche a basso peso molecolare, e ciò richiede particolari attenzioni dietologiche (Sollid, 2000).

Il problema da risolvere è quello di produrre delle farine anallergiche ma lievitanti cioè atte a formare impasti impiegabili per ottenere prodotti da forno ed aventi le stesse proprietà tecnologiche degli impasti ottenuti con farine di frumento (Schuppan e Hahn, 2002).

La presente invenzione propone una soluzione ottimale a tale problema e consente di ottenere delle farine anallergiche ma lievitanti.

DESCRIZIONE

L'invenzione viene ora chiarita con riferimento, a semplice titolo di esempio non limitativo, al trasferimento nella farina di riso della capacità di generare impasti lievitanti, elastici ed atti ad ottenere un prodotto da forno con elevato volume specifico. E' noto che il riso è un cereale dal profilo nutrizionale molto particolare ed è considerato l'alimento più adatto per l'alimentazione dei bambini e degli anziani. Il riso infatti è un alimento ipoallergenizzante, altamente digeribile, con un profilo proteico non molto vario ma di elevata qualità. L'elevata digeribilità è dovuta alla piccola dimensione dei granuli di amido che risultano venti volte più piccoli di quelli di frumento e settanta volte più piccoli di quelli della patata.

Il riso è il secondo cereale dopo il frumento in termini di coltivazioni mondiali; le risaie coprono quasi centocinquanta milioni di ettari e producono ogni anno cinquecento milioni di tonnellate di riso. L'Italia in particolare è il primo produttore europeo con circa duecentomila ettari coltivati. Il riso è tra i cereali maggiori quello con il genoma più ridotto essendo sessanta volte inferiore a quello del frumento e dodici volte più piccolo di quello del mais. Il suo genoma, costituito da 12 cromosomi, è completamente sequenziato. La disponibilità della sequenza di tutti i geni di questa specie rende possibile lo studio delle sue componenti proteiche di riserva e facilita la modifica del suo corredo genetico utilizzando regioni di regolazione specifiche delle componenti di riserva del seme.

L'invenzione inoltre riguarda la costruzione di nuovi plasmidi di espressione che consentono la produzione e l'accumulo nel seme di piante quali il riso, il mais e la soia di proteine di riserva del frumento ed enzimi di origine animale. I nuovi plasmidi di espressione consentono un accumulo tessuto specifico delle proteine.

Nella presente descrizione viene riportato il lavoro di progettazione e di realizzazione del sistema di espressione in pianta, con la verifica della sua validità in una pianta quale il riso. Al fine di ottenere l'espressione seme-specifica delle proteine si sono utilizzati i promotori e le sequenze segnale appartenenti sia ai geni di frumento che ai geni di proteine di riserva del riso.

Queste sequenze di regolazione e strutturali sono state isolate e clonate dalle varietà di frumento Cheienne, Centauro, Golia, Pandas e Veronese. Il gene per la proteina animale transglutaminasi è stato clonato a partire da cDNA di tessuto di fegato di criceto. Tutte le componenti geniche clonate sono state controllate a livello di sequenza. Le sequenze clonate sono state utilizzate tal



quali o dopo mutagenesi per eliminare eventuali epitopi riconosciuti come attivatori della risposta immunitaria nei pazienti con allergia al glutine. I costrutti finali utilizzati per la trasformazione del riso, ma utilizzabili anche in altri cereali e nelle leguminose, sono stati realizzati in vettori del tipo pUC 19 e con questi si sono trasformati embrioni immaturi di riso varietà Ariete e Rosa Marchetti mediante cotrasformazione dei costrutti con metodi fisici. Per ogni esperimento di trasformazione, realizzato utilizzando fino a 10 costrutti in varie combinazioni, si sono selezionate circa 100 piante transgeniche (T_0) igromicina resistenti e queste controllate a livello molecolare con tecniche PCR. L'eventuale ulteriore combinazione di geni di interesse in una unica linea transgenica è stata realizzata mediante incrocio seguito da diploidizzazione di linee aploidi, rigenerate da coltura di antere, per raggiungere prima lo stato di omozigosi di ogni singolo transgene presente. Il controllo della specificità di accumulo delle varie proteine nel seme è stato eseguito con tecniche dot blot e Western utilizzando anticorpi policlonali sviluppati contro le proteine prodotte in *E. coli*.

Dunque l'invenzione rende disponibili: (1) nuove varietà di riso differenziate dalla capacità di accumulo di diverse proteine di riserva di frumento e di un enzima animale in grado di favorire la formazione di legami intercatena tra le proteine stesse; (2) nuovi vettori plasmidici costruiti per la produzione di proteine di riserva del frumento in altri cereali; (3) una farina di riso con caratteristiche tecnologiche simili a quelle delle farine di frumento.

Un'altra inclusione dell'invenzione comprende i seguenti componenti funzionalmente legati da 5' a 3' a formare un vettore di espressione plasmidiale: (a) un promotore; (b) una sequenza nucleotidica corrispondente alla sequenza aminoacidica delle glutenine di frumento aventi una

certa sequenza c-terminale, oppure alla transglutaminasi di criceto; (c) un segnale di poliadenilazione.

Le sequenze di DNA da (a) a (c) sono clonate in vettori diversi a formare plasmidi. I plasmidi di espressione risultanti possono essere utilizzati per la trasformazione di cellule vegetali con metodi fisici diretti. Le cellule vegetali trasformate sono selezionate e indotte a formare piante intere fertili in grado di formare semi e questi di esprimere i geni delle proteine di riserva o enzimatica.

Un'altra inclusione dell'invenzione comprende sequenze nucleotidiche di glutenine di frumento modificate, con tecniche di mutagenesi diretta, per eliminare sequenze aminoacidiche riconosciute come allergiche nelle allergie alimentari al glutine.

Un'altra inclusione dell'invenzione comprende l'uso di farine ricavate da seme di piante trasformate con i plasmidi sopra menzionati, per la produzione di prodotti da forno, previo impasto e fermentazione.

Breve descrizione delle tabelle e figure

Le caratteristiche, le inclusioni e gli obiettivi dell'invenzione, brevemente richiamati in precedenza, diventeranno più chiari e comprensibili considerando le didascalie delle tabelle e figure che seguono. Si fa notare però che gli esempi in figura illustrano inclusioni preferenziali dell'invenzione e perciò non si intendono limitative degli scopi.

Tabella 1. Mostra alcune delle sequenze aminoacidiche delle proteine di frumento scelte per l'espressione in riso e il motivo c-terminale LKVAKAQQLAAQLPAMCR conservato (posizione 945-962).

Tabella 2. Mostra la sequenza nucleotidica del gene per l'enzima transglutaminasi di criceto.

Tabella 3. Mostra una delle sequenze nucleotidiche della regione di regolazione di riso utilizzate per l'espressione seme specifica dei geni di frumento e criceto.

Tabella 4. Riporta la sequenza degli oligonucleotidi utilizzati per il clonaggio dei geni di alcune delle proteine di riserva di frumento e dell'enzima transglutaminasi di criceto.

Tabella 5. Riporta il risultato di un test ELISA eseguito su farina di frumento, farina di riso e nuova farina della linea PLT3000R13-7.

Figura 1. Riporta il plasmide pIGP 2001 ottenuto dal clonaggio del gene 1Bx7 di frumento.

Figura 2. Riporta il plasmide pIGP 2002 ottenuto dal clonaggio del gene 1By9 di frumento.

Figura 3. Riporta il plasmide pIGP 2003 ottenuto dal clonaggio del gene 1Dx5 di frumento.

Figura 4. Riporta il plasmide pIGP 2004 ottenuto dal clonaggio del gene 1Dy10 di frumento.

Figura 5. Riporta il plasmide pIGP 2005 ottenuto dal clonaggio del gene 1Ax2 di frumento.

Figura 6. Riporta il plasmide pPLT 2006 ottenuto dal clonaggio del gene 1Bx17 di frumento.

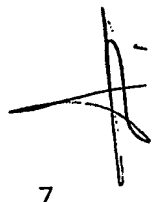
Figura 7. Riporta il plasmide pIGP 2008 ottenuto dal clonaggio del gene GluHMW2 di frumento.

Figura 8. Riporta il plasmide pIGP 2009 ottenuto dal clonaggio del gene Glu1A di frumento.

Figura 9. Riporta il plasmide pIGP 2010 ottenuto dal clonaggio del gene 1Ax1 di frumento.

Figura 10. Riporta il plasmide pIGP 2012 ottenuto dal clonaggio del gene 1Dy12 di frumento.

Figura 11. Riporta il plasmide pIGP 2050 ottenuto dal clonaggio della variante MUT1 del gene 1Dy10 di frumento.



7

Figura 12. Riporta il plasmide pIGP 2051 ottenuto dal clonaggio della variante MUT1 del gene 1By9 di frumento.

Figura 13. Riporta il plasmide pIGP 2052 ottenuto dal clonaggio della variante MUT3 del gene 1By9 di frumento.

Figura 14. Riporta il plasmide pIGP 2100 ottenuto dal clonaggio del gene che codifica per la transglutaminasi (TG) di criceto.

) Figura 15. Come esempio si riporta un gel di agarosio con il DNA risultante dalla amplificazione mediante PCR, eseguita utilizzando primer specifici per singoli geni di frumento, su DNA estratto da piante di riso T₀ trasformate con i plasmidi delle figure 1-14.

Figura 16. Come esempio si riportano i risultati dell'analisi Southern eseguita su alcune piante T₁ della figura 15, trsformate con i plasmidi delle figure 1-14.

Figura 17. Come esemio si riporta un gel SDS-PAGE di proteine totali estratte da semi delle piante transgeniche T₂ indicate e l'analisi Western delle stesse, dopo trasferimento su membrana, utilizzando anticorpi policlonali specifici per la proteina di riserva di frumento 1By9.

) Figura 18. Come esempio si riporta un gel SDS-PAGE di proteine totali estratte da semi delle piante transgeniche indicate e l'analisi Western delle stesse, dopo trasferimento su membrana, utilizzando un anticorpo policlonale specifico per la transglutaminasi (TG) di criceto.

Figura 19. Come esempio si riporta un gel SDS-PAGE di proteine totali estratte da linee transgeniche di riso trasformate con il gene per la proteina 1Dy10 e l'analisi Western delle stesse, dopo trasferimento su membrana, utilizzando un anticorpo policlonale specifico.

Figura 20. Come esempio si riporta una elettroforesi monodimensionale delle proteine di riserva di alcune varietà di frumento con evidenziate le bande corrispondenti ai geni clonati.

Figura 21. Come esempio si riporta una elettroforesi monodimensionale delle proteine di riserva di frumento dove sono visibili le due classi di glutenine ad elevato e basso peso molecolare.

Figura 22. Come esempio si riporta il risultato di una analisi Western eseguita sulle proteine della figura 21, dopo trasferimento su membrana, utilizzando il siero di un paziente con allergia al glutine, per evidenziare il riconoscimento quasi esclusivo delle glutenine a basso peso molecolare.

Figura 23. Come esempio si riporta il risultato di una prova di panificazione eseguita utilizzando, nell'impasto, la farina prodotta da una linea transgenica di riso (destra) che esprime le proteine di frumento 1Ax1, 1Dx2, 1Dx5, 1Bx6, 1Bx7, 1Bx17, MUT11Dx10, MUT11By9 e l'enzima TG a confronto con una farina di riso normale (sinistra).

Figura 24. Come esempio si riporta, in sezione, il risultato della prova descritta in figura 23 per mostrare l'alveolatura e la lievitazione ottenuta con la nuova farina a confronto con una farina di riso.

Figura 25. Come esempio si riporta l'alveogramma ottenuto con la nuova farina ricavata dal seme della linea riportata in figura 23.

Figura 26. Come esempio la figura riporta il risultato di una analisi PCR per dimostrare la presenza del gene per l'enzima transglutaminasi nelle linee trasformate.



Descrizione dettagliata dell'invenzione

Per il clonaggio delle sequenze corrispondenti ai geni delle glutenine ad elevato peso molecolare, di frumento, con o senza la regione di regolazione, è stata utilizzata la tecnica della reazione a catena della polimerasi (PCR) a partire dalle informazioni di sequenza presenti in banca dati. In questo caso si è utilizzato DNA genomico estratto da foglie di *Triticum aestivum* delle cultivar Cheienne, Chiarano, Centauro, Golia, Pandas e Veronese. Alcuni degli oligonucleotidi utilizzati per l'amplificazione specifica sono riportati in tabella 4.

Per il clonaggio della sequenza corrispondente al gene di criceto che codifica per l'enzima transglutaminasi è stata utilizzata la tecnica RT-PCR. In questo caso si è utilizzato RNA totale estratto da fegato di criceto e gli oligonucleotidi utilizzati per l'amplificazione sono riportati in tabella 4. Una volta clonati i geni che codificano per le proteine di frumento sono stati utilizzati tal quali oppure sottoposti a cicli di mutagenesi sito diretta per sostituire specifici aminoacidi. In particolare le sequenze nucleotidiche modificate codificano per le sequenze aminoacidiche del tipo, a solo titolo di esempio non limitativo, PFPQPQLPY, PQPQLPYYPQ, PYPQPQLPY, LQLQFPQPQLPY, QQGY^YPTSPQQSG, QQGY^YPTS, PFSQQQQQ, QSEQSQQPFQPPQ e QXPQQPQQF ponendo particolare attenzione alla sostituzione delle glutamine e degli altri aminoacidi nelle posizioni sottolineate (Willemun et al., 2002; Shan et al., 2002).

Per il promotore PROL di riso si è partiti da informazioni di sequenza ricavate da esperimenti di differential display che evidenziavano la specificità d'espressione nel seme del clone originale. A seguito del confronto di sequenza in banca dati il clone è risultato corrispondere al 100% alla

sequenza con Acc. Number AF156714 e da questa si è partiti per il clonaggio con tecnica PCR dal DNA genomico della varietà Ariete.

Nel caso del frumento i prodotti dell'amplificazione corrispondono alle dimensioni attese per i singoli geni in base ai dati di sequenza EMBL. Nel caso del promotore di riso il DNA stampo è stato estratto da foglie di *Oryza sativa* varietà Ariete e il prodotto di amplificazione corrisponde alle dimensioni attese in base ai dati di sequenza EMBL.

A partire dai frammenti amplificati, mediante ligazione nel vettore pGEM-T, si sono costruiti i vettori da cui i singoli frammenti sono stati recuperati, utilizzando gli enzimi indicati, per inserirli nel vettore pPLT 100 (derivato da pUC19) ed ottenere i costrutti finali riportati nelle figure 1-14. I plasmidi ottenuti sono stati controllati mediante analisi di restrizione con diversi enzimi e un clone per tipo è stato scelto e sequenziato. I cloni sequenziati si sono rilevati identici alle sequenze presenti in banca dati, con l'eccezione della sequenza del promotore PROL che presentava alcune differenze nucleotidiche con la sequenza depositata. I plasmidi pIGP2001, pIGP2002, pIGP2003, pIGP2004, pIGP2005, pPLT2006, pIGP2008, pIGP2009, pIGP2010, pIGP2012, pIGP2050, pIGP2051, pIGP2052, pIGP2100 e pIGP2500 (che porta il gene di resistenza all'igromicina, utilizzata per la selezione dei trasformati) sono stati purificati da colture cellulari di *E. coli* e il DNA utilizzato per la trasformazione degli embrioni di riso con tecnica biolistica.

Le piante T₀ sono state controllate mediante PCR (figura 15), le T₁ mediante analisi Southern (figura 16) e le T₂ e generazioni successive, mediante analisi Western (figure 17, 18 e 19). Le piante positive alla PCR portavano tutte all'accumulo della proteina corrispondente, riconosciuta

dagli anticorpi specifici, solo nel seme. La presenza della proteina ricombinante solo nel seme e non nelle foglie è stata verificata in tutte le piante transgeniche esaminate.

Esempio 1: Clonaggio dei geni che codificano per le proteine di frumento.

I geni di interesse sono stati clonati a partire da DNA genomico di frumento estratto da singole varietà conosciute per avere una buona espressione della proteina di interesse. Si sono utilizzate principalmente le varietà di frumento tenero Cheienne, Chiarano, Centauro, Golia, Pandas e Veronese. Il DNA genomico è stato utilizzato come template in reazioni di PCR che si sono dovute ottimizzare per ogni singolo gene (Mullis e Faloona, 1987). Come esempio di seguito si riportano le condizioni utilizzate per l'amplificazione del gene Ax1: denaturazione iniziale a 98°C per 3 min, seguita da 38 cicli con denaturazione a 95°C per 1 min, annealing a 62°C per 1 min, estensione a 72°C per 4 minuti, seguita da una sintesi finale a 72°C per 10 min. I primer utilizzati sono stati disegnati, per ogni singolo gene (tabella 4), considerando sia la parte strutturale da sola, a partire dall'ATG fino al codone di stop, sia la parte strutturale più la regione di regolazione in 5' e in 3'.

I frammenti amplificati sono stati clonati nel vettore pGEM-T (Promega), sequenziati e subclonati sia in vettori per l'espressione in *E. coli* (pET 28) per produrre la proteina da utilizzare nell'immunizzazione dei conigli, sia in vettori di espressione specifici per riso (pPLT 100). Nei casi in cui i geni sono stati modificati questi sono stati sottoposti a cicli di mutagenesi eseguita nel vettore pGEM, seguita da un ulteriore sequenziamento per la verifica delle variazioni introdotte nei codoni.

Esempio 2: Trasformazione genetica di embrioni di riso.

Le piante delle varietà di riso Ariete e Rosa Marchetti, scelte per l'esecuzione della trasformazione genetica, sono state seminate in serra a marzo. All'epoca della fioritura le singole spighe sono state cartellate indicando la data esatta di fioritura e dopo 11 giorni gli embrioni immaturi sono stati excisi dal seme, in condizioni sterili, per la trasformazione genetica con metodi fisici, utilizzando lo strumento PDS-1000/He (BioRad). La modifica genetica è stata eseguita utilizzando una tecnica di co-trasformazione in cui il marcatore di selezione (resistenza all'igromicina) era presente su un plasmide separato (pIGP 2500) da quelli contenenti i geni di interesse (pIGP 2001-2100).

Negli esperimenti di trasformazione la concentrazione totale di DNA era di 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, utilizzando 0,6 μg di DNA per ogni bombardamento del tessuto bersaglio. Il rapporto tra DNA con il marcatore di selezione e DNA con il gene o i geni di interesse era 1:5 (calcolato sul numero di molecole). Quando la trasformazione comprendeva più geni di interesse il rapporto rimaneva costante tra plasmide di selezione e il plasmide con il gene di interesse (1:5), mentre i geni di interesse tra di loro rimanevano nel rapporto 1:1 (es. per 6 geni il rapporto molare finale era di 1:5:5:5:5:5). La trasformazione è stata realizzata trasferendo sia il plasmide marker in combinazione con un solo plasmide con il gene di interesse, sia con diversi (fino a 10) plasmidi con i geni di interesse (Chen et al., 1998). Nel caso di trasformazione con uno o pochi geni di interesse, o quando l'analisi molecolare ha evidenziato la presenza di solo alcuni dei geni introdotti, le linee transgeniche ottenute sono state incrociate tra di loro per riunire in una unica linea i diversi geni. Le singole piante segreganti che presentavano i geni di interesse sono state diploidizzate a partire da aploidi ottenuti dalla coltura di antere, per garantire l'omozigosi dei



singoli geni. Gli espianti bersaglio, approssimativamente 30 embrioni immaturi, vanivano raggruppati al centro di una capsula Petri, 6 giorni dopo il prelievo, contenente il terreno osmotico NB con 0,4 M mannitolo. Dopo incubazione per 4 ore gli embrioni venivano bombardati, utilizzando particelle d'oro, diametro 1,5-3,0 micron, per 2 volte alla pressione di 1100 psi e 27 inches di vuoto di Hg. Ventiquattro ore dopo il bombardamento gli embrioni venivano trasferiti singolarmente in terreno NB ed incubati per 3 giorni a 28°C al buio e poi trasferiti su terreno solido di selezione contenente 50 mg/litro di igromicina B. Dopo 2 settimane di selezione gli embrioni venivano trasferiti in un terreno di selezione liquido R2 (Ohira et al. 1973) supplementato con 1 mg/l di 2,4-D, 1 mg/l tiamina, 30 g/l saccarosio e 50 mg/l igromicina B. Gli embrioni venivano mantenuti a 90 rpm su una piastra rotante per altre 2 settimane, cambiando il terreno a metà periodo. Quando i calli resistenti alla igromicina diventavano visibili venivano trasferiti in un terreno per aumentare la massa di callo (R21) e poi al terreno di rigenerazione (MS), contenente 2,5 mg/l BAP e 0,5 mg/l NAA, alla luce con fotoperiodo di 16 ore. Gli apici rigenerati venivano poi trasferiti in terreno di radicazione per 4 settimane e poi nei vasi in serra.

Esempio 3: Produzione di un impasto

La produzione dell'impasto è stata eseguita seguendo una identica procedura per la farina di frumento (var. Veronese), la farina di riso (var. Rosa Marchetti) e la nuova farina (linea PLT300R13-7). 500 gr di farina sono stati impastati con 350 ml di acqua, 10 gr di sale, 10 gr di zucchero e 7 gr di lievito secco attivo. L'impasto è stato ottenuto utilizzando un autobakeri e



lavorando la miscela per un tempo di 10 minuti. L'impasto è stato mantenuto in lievitazione per 1 ora a 37°C, seguito dalla cottura a 200°C per 60 minuti.

Bibliografia: Chen L., et al. 1998. *Nature Biotechnology* 16:1060. Mullis K.B., Faloona F.A. 1987. *Method. Enzymol.* 155:335. Ohira K., Ojima K., Fujiwara A. 1973. *Plant Cell Physiol.* 14:1113. Sanford J.C., Smith F.D., Russell J.A. 1993. *Meth. Enzymol.* 317:483. Schuppan D., Hahn E.G. 2002. *Science* 297:2218. Shan L. et al. 2002. *Science* 297:2275. Sollid L.M. 2000. *Annu. Rev. Immunol.* 18:53. Willemun V., et al. 2002. *Gastroenterology* 122:1729.

RIVENDICAZIONI

1. Una farina ad uso alimentare con specifiche caratteristiche tecnologiche quali la capacità di lievitare e caratteristiche alimentari quali bassa allergenicità;
2. Una farina come al punto 1 derivata dal seme di una pianta ottenuta inserendo nel suo genoma uno o più geni che codificano per proteine di riserva del frumento;
3. Una farina derivata dal seme di una pianta ottenuta inserendo nel suo genoma un gene che codifica per l'enzima transglutaminasi;
4. Una farina derivata dal seme di una pianta ottenuta inserendo nel suo genoma diverse combinazioni dei geni indicati nelle rivendicazioni 2 e 3;
5. Una farina derivata dal seme di una pianta di riso modificata geneticamente inserendo nel suo genoma i geni secondo la rivendicazione 4;
6. Una farina derivata dal seme di una pianta di mais modificata geneticamente inserendo nel suo genoma i geni secondo la rivendicazione 4;



7. Una farina derivata dal seme di una pianta di soia modificata geneticamente inserendo nel suo genoma i geni secondo la rivendicazione 4;
8. Una sequenza nucleotidica che codifica per la sequenza aminoacidica LKVAQAQQLAAQLPAMCR presente nella parte C-terminale di una classe delle proteine di riserva di frumento;
9. Un plasmide ricombinante comprendente: (i) una sequenza di DNA di regolazione specifica di una pianta; (ii) una sequenza strutturale di una proteina di riserva di frumento;
10. Un plasmide ricombinante comprendente: (i) una sequenza di DNA di regolazione specifica di una pianta, per esempio di riso; (ii) una sequenza strutturale di una proteina di riserva di frumento contenente la sequenza aminoacidica del punto 8;
11. Un plasmide ricombinante comprendente: (i) una sequenza di DNA di regolazione specifica di una pianta; (ii) una sequenza strutturale di una proteina di riserva di frumento modificata mediante tecniche di ingegneria proteica per eliminare specifici epitopi;
12. Un plasmide ricombinante secondo le rivendicazioni 9 e 11 e dove la sequenza di regolazione della cassetta di espressione proviene dal gene corrispondente alla proteina di riserva di frumento;
13. Un plasmide ricombinante secondo la rivendicazione 9 e dove la sequenza di regolazione della cassetta di espressione proviene dal gene corrispondente ad una proteina di riserva di un cereale o di una leguminosa;
14. Un plasmide ricombinante secondo la rivendicazione 9 dove la sequenza strutturale corrisponde alla proteina enzimatica transglutaminasi;



15. Cellule vegetali trasformate con il DNA di una delle rivendicazioni da 9 a 14;
16. Cellule vegetali trasformate con il DNA di due o più delle rivendicazioni da 9 a 14 in diverse combinazioni;
17. Piante trasformate esprimenti i geni presenti nei plasmidi delle rivendicazioni da 9 a 14;
18. Piante trasformate esprimenti i geni presenti in due o più dei plasmidi delle rivendicazioni da 9 a 14;
19. La produzione di farine a partire dal seme delle piante delle rivendicazioni da 2 a 7, ottenute con tecniche molitorie specifiche;
20. La produzione di prodotti da forno ottenuti a partire da farine o concentrati proteici della rivendicazione 19;
21. La produzione dell'enzima transglutaminasi partendo da farine derivate dal seme delle piante della rivendicazione 3, 4, 5, 6 e 7.

PER INCARICO DELLE SOCIETA' RICHIEDENTI

IL MANDATARIO

AVVOCATO TROMBETTI Gioia



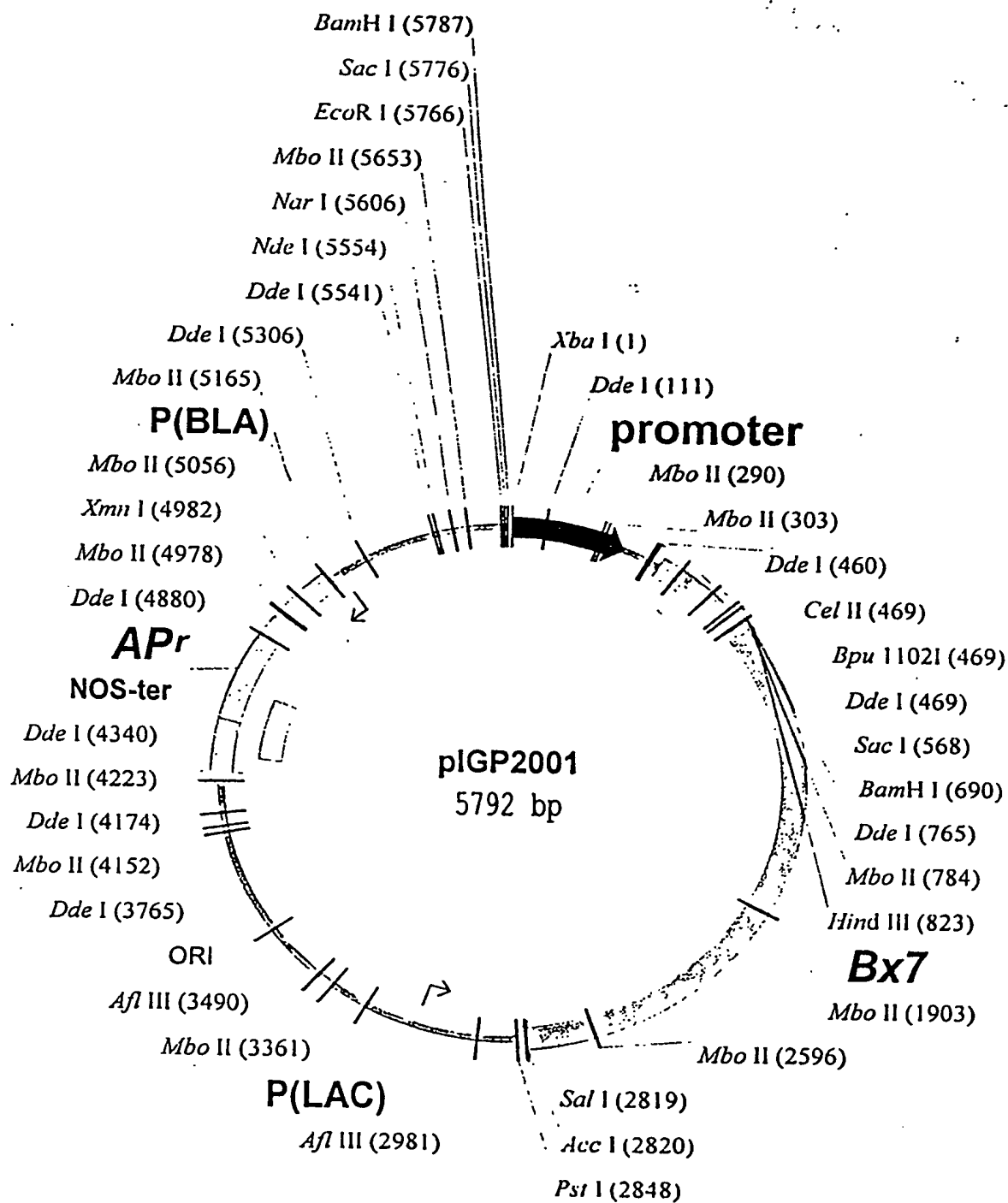
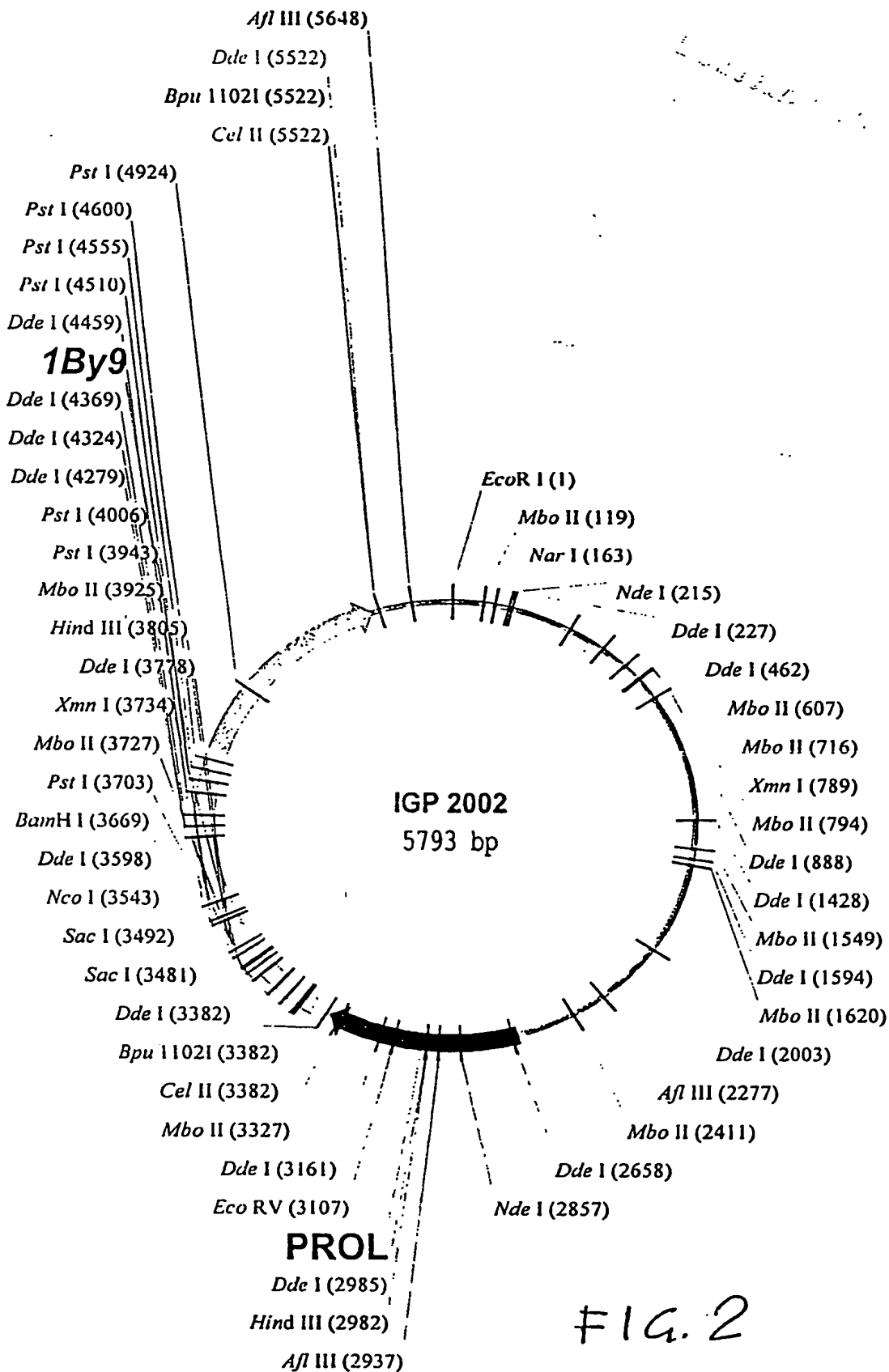


FIG. 1



CAMERA DI COMMERCIO INDUSTRIA
ARTIGIANATO E AGRICOLTURA
DI BOLOGNA
UFFICIO BREVETTI
IL FUNZIONARIO

[Handwritten signature]



CAMERA DI COMMERCIO INDUSTRIA
ARTIGIANATO E AGRICOLTURA
DI BOLOGNA
UFFICIO BREVETTI

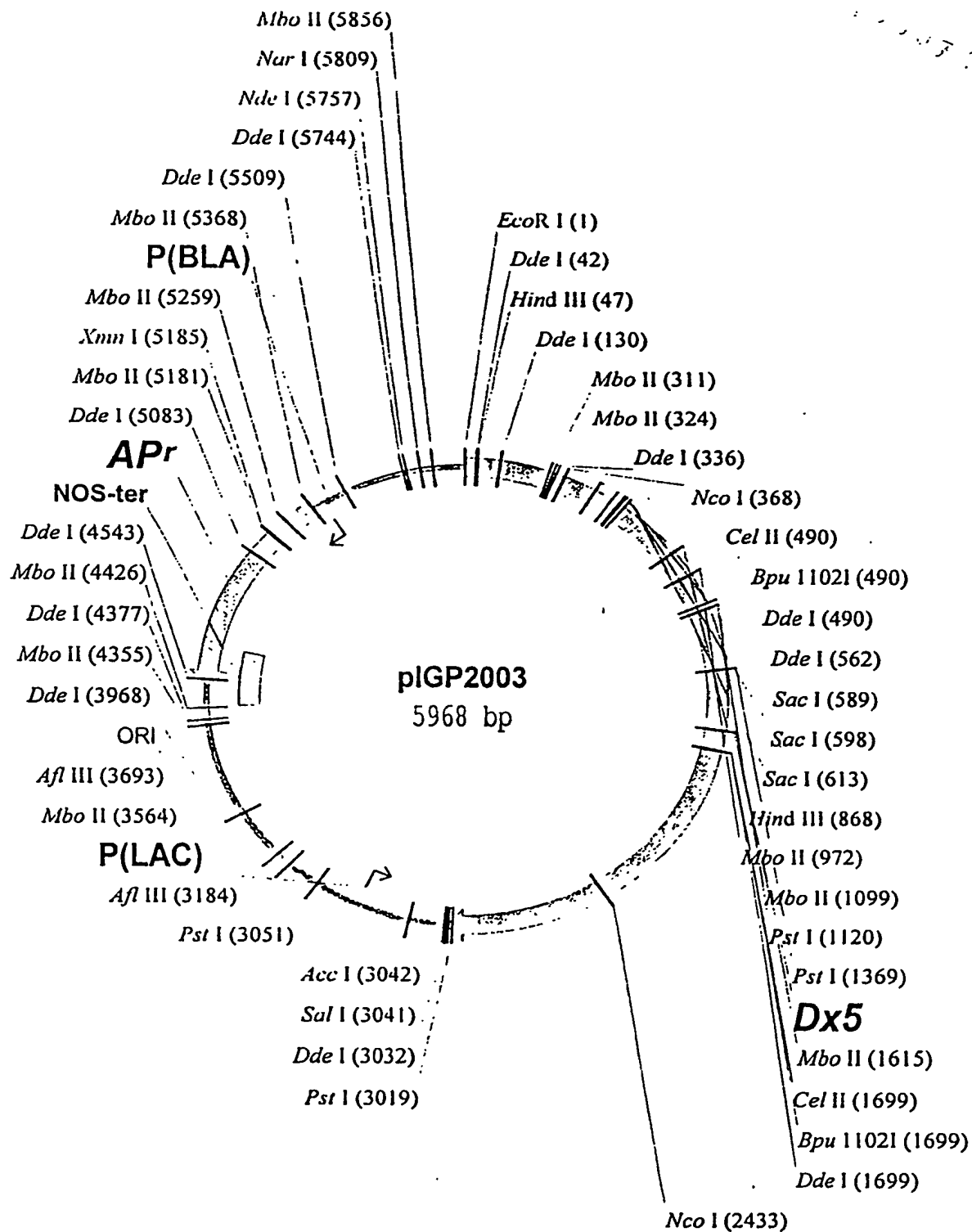


FIG. 3



CAMERA DI COMMERCIO INDUSTRIA
ARTIGIANATO E AGRICOLTURA
DI BOLOGNA
UFFICIO BREVETTI
IL FUNZIONARIO



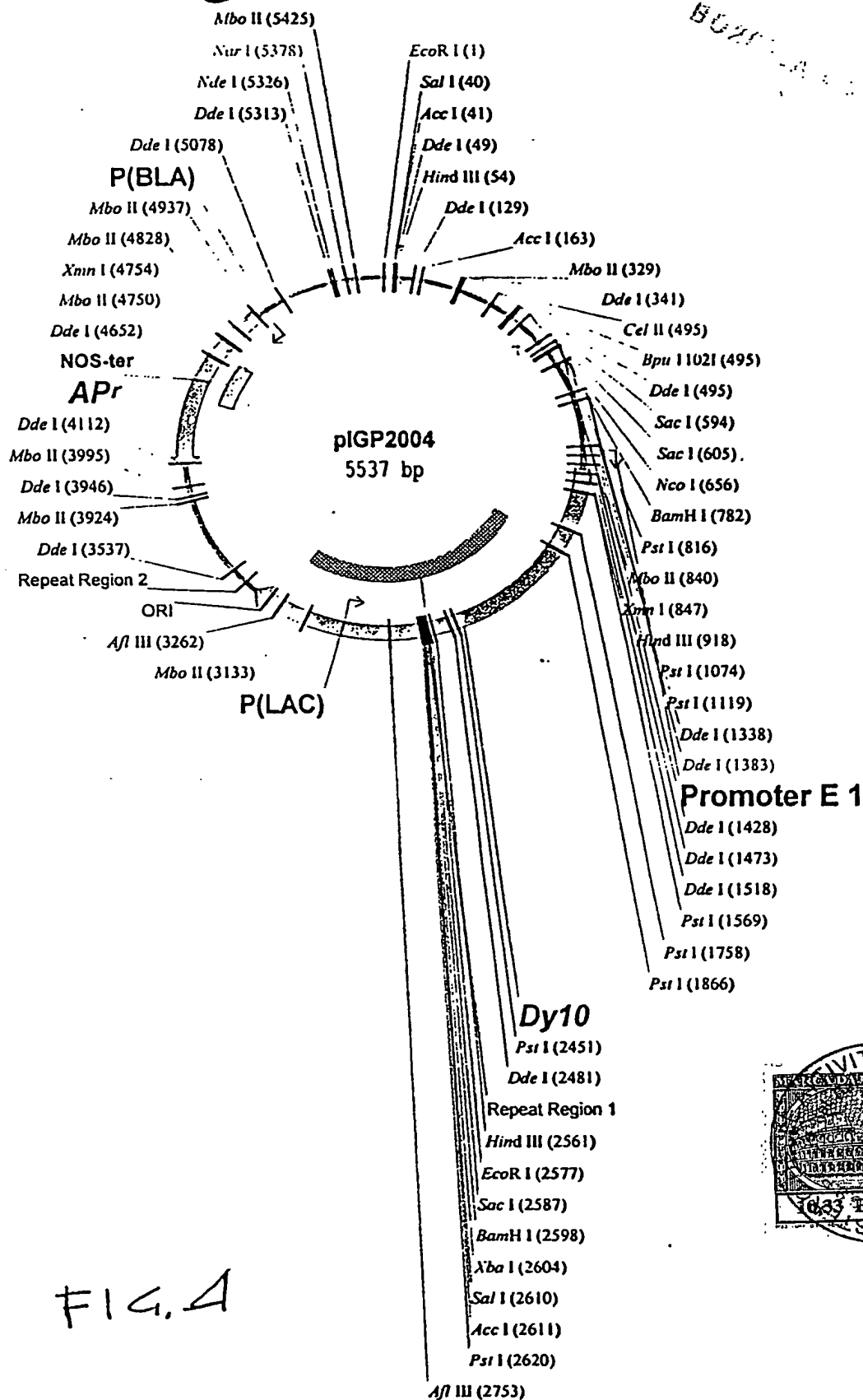
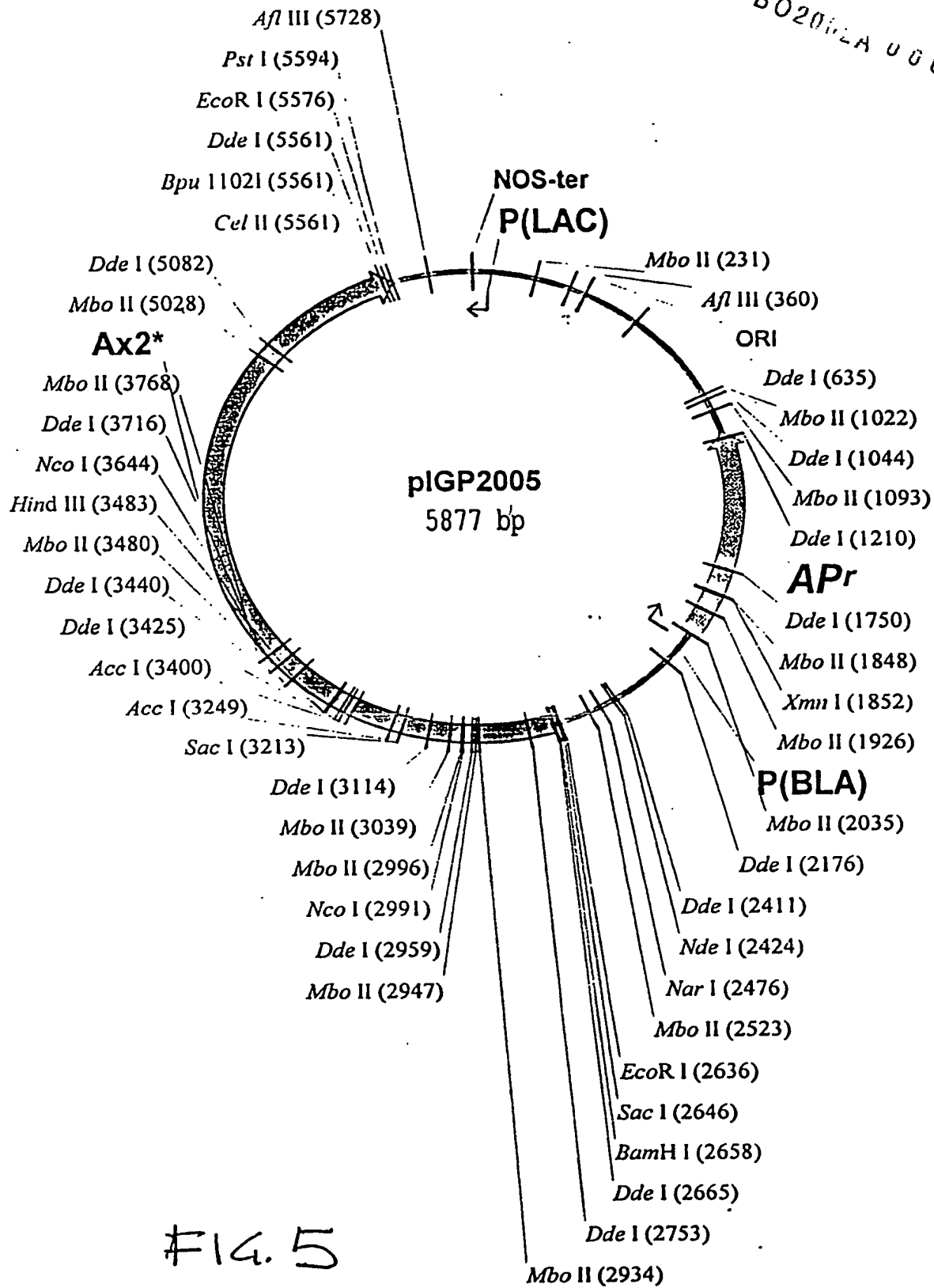


FIG. 4



CAMERA DI COMMERCIO INDUSTRIA
ARTIGIANATO E AGRICOLTURA
DI BOLOGNA
UFFICIO BREVETTI

B02012A 000714



#14.5



CAMERA DI COMMERCIO INDUSTRIA
ARTIGIANATO E AGRICOLTURA
DI BOLOGNA
UFFICIO BREVETTI
IL FUNZIONARIO

[Handwritten signature]

BO2002A 000714

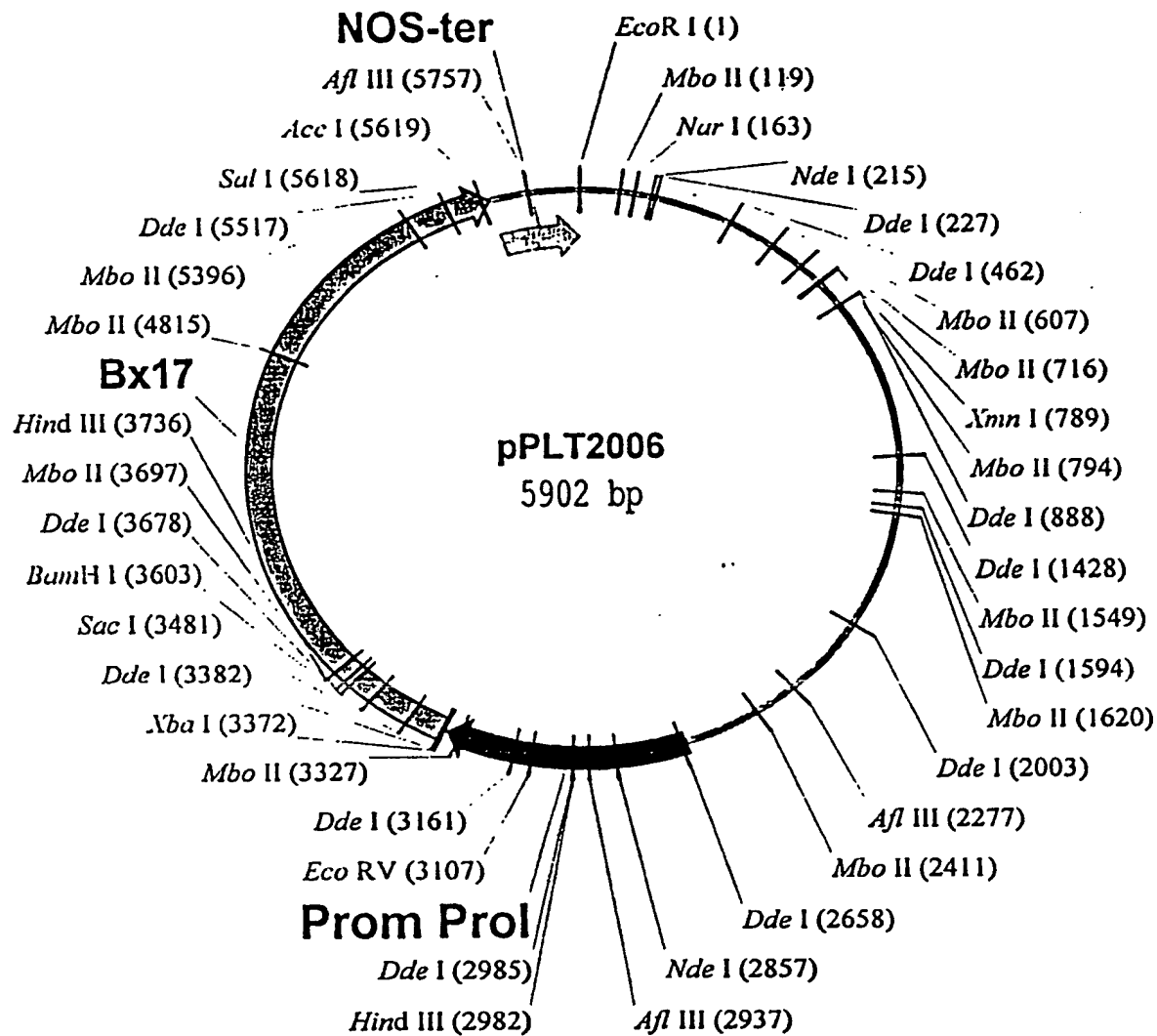
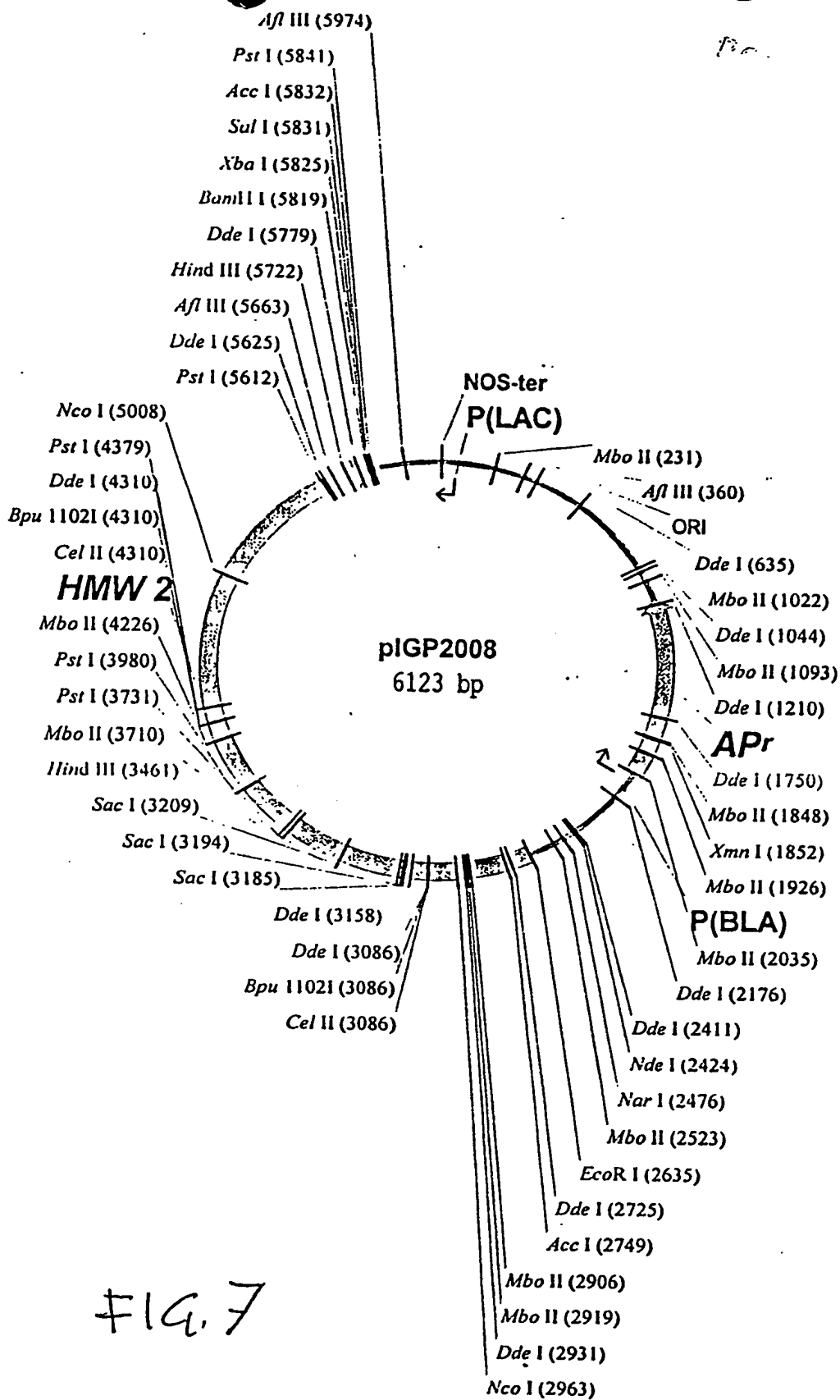


FIG. 6



CAMERA DI COMMERCIO INDUSTRIA
ARTIGIANATO E AGRICOLTURA
DI BOLOGNA
UFFICIO BREVETTI
IL FUNZIONARIO



#14.7



CAMERA DI COMMERCIO INDUSTRIA
ARTIGIANATO E AGRICOLTURA
DI BOLOGNA
UFFICIO BREVETTI
IL FUNZIONARIO

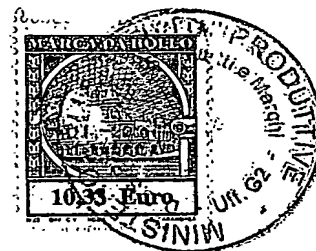
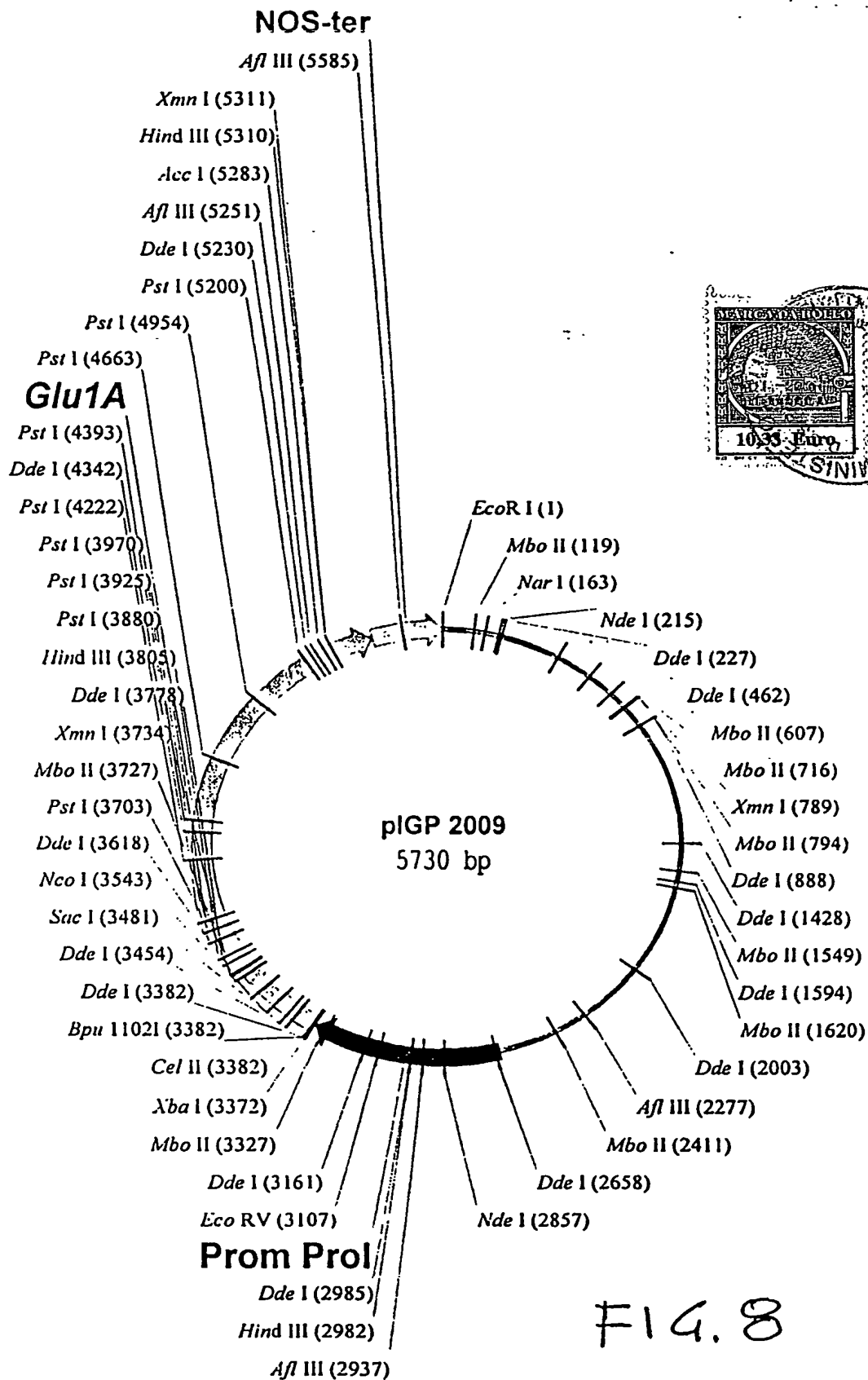


FIG. 8



CAMERA DI COMMERCIO INDUSTRIA
ARTIGIANATO E AGRICOLTURA
DI BOLOGNA
UFFICIO BREVETTI
IL FUNZIONARIO

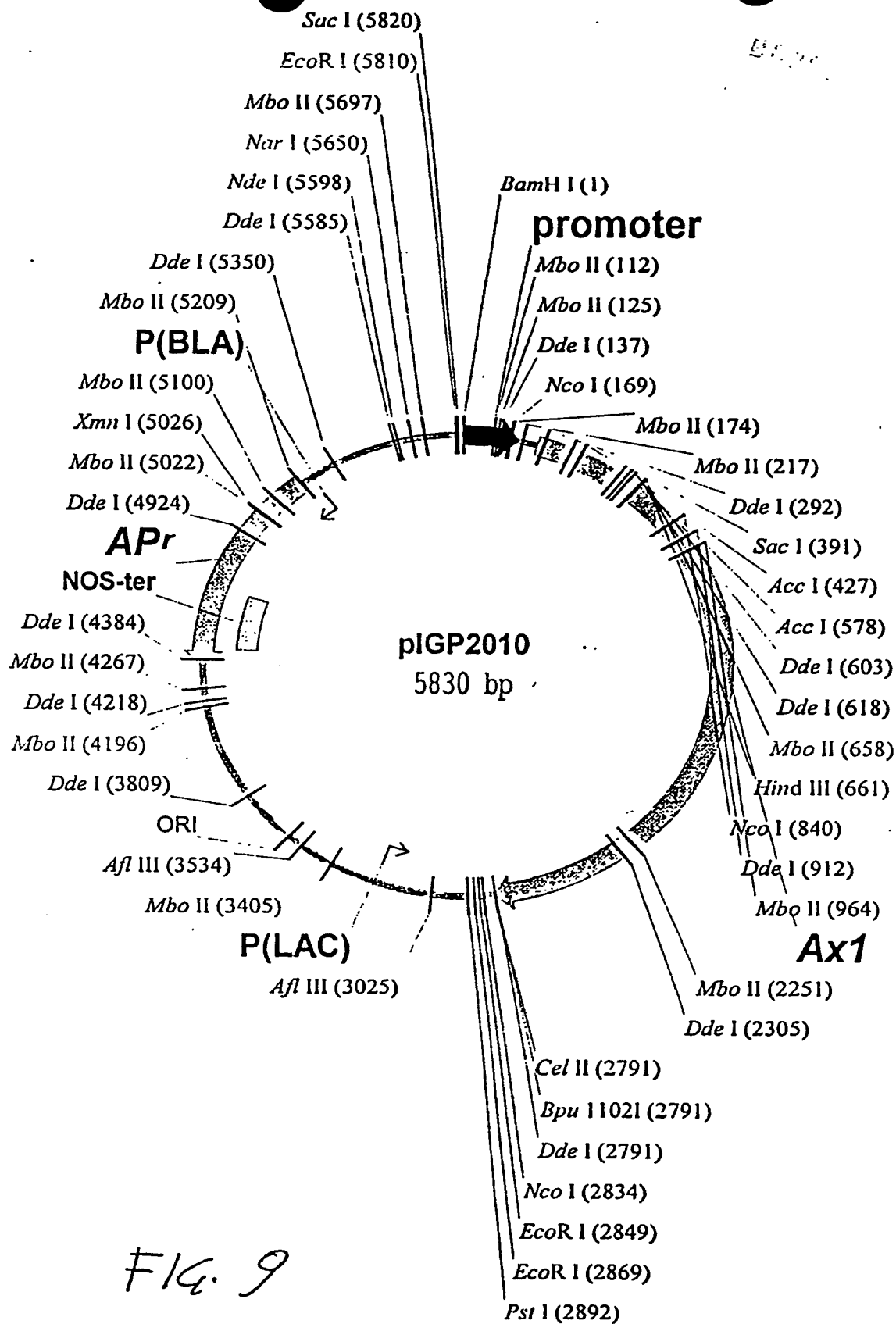


FIG. 9



CAMERA DI COMMERCIO INDUSTRIA
AGRICOLTURA E AGRICOLTURA
DI BOLOGNA
UFFICIO BREVETTI
IL FUNZIONARIO

[Handwritten signature]

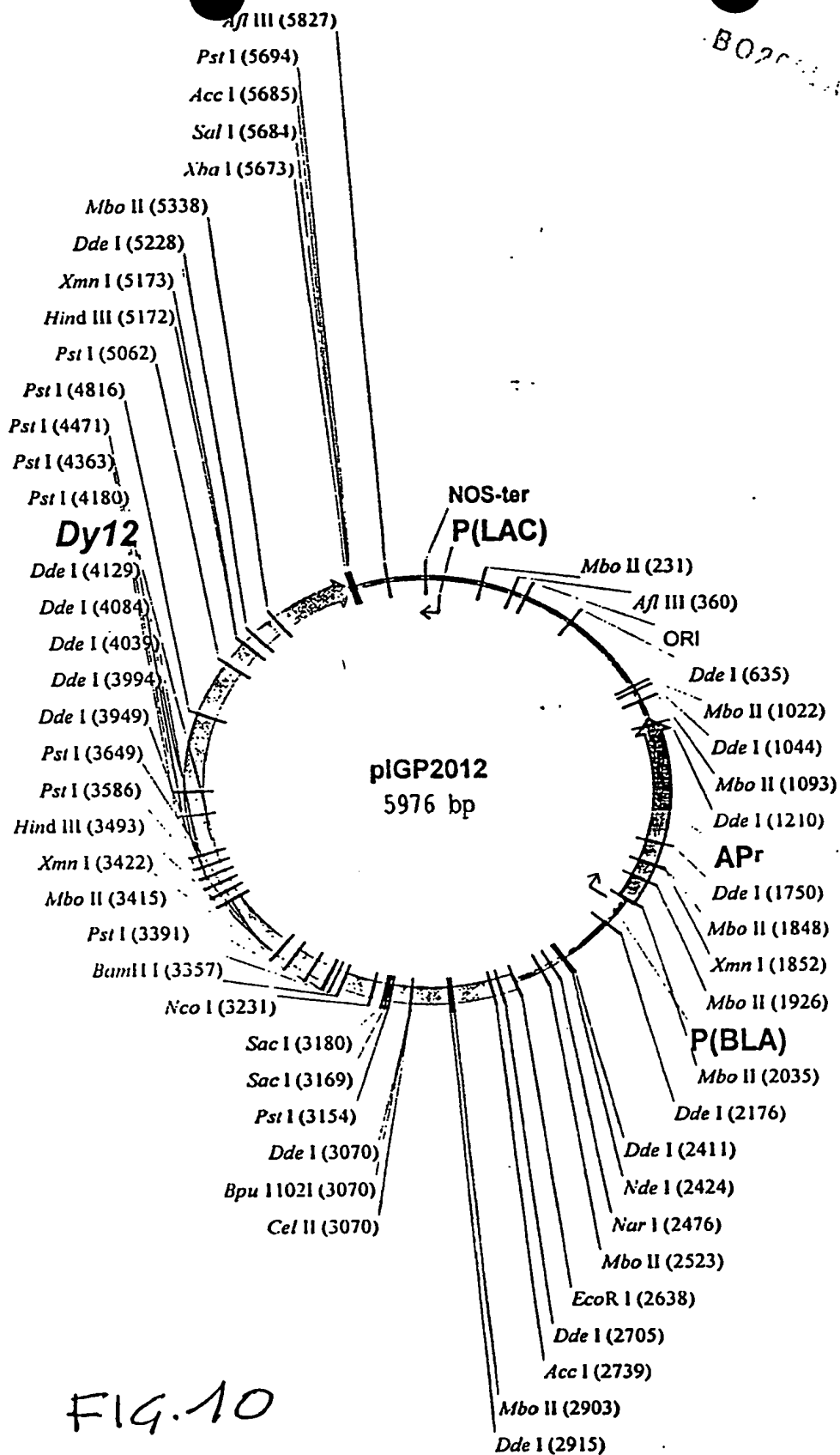


FIG. 10



MINISTERO DEL COMMERCIO INDUSTRIALE
ARTIGIANATO E AGRICOLTURA
DIECOLOGIA
UFFICIO BREVETTI
IL FUNZIONARIO

[Handwritten signature]

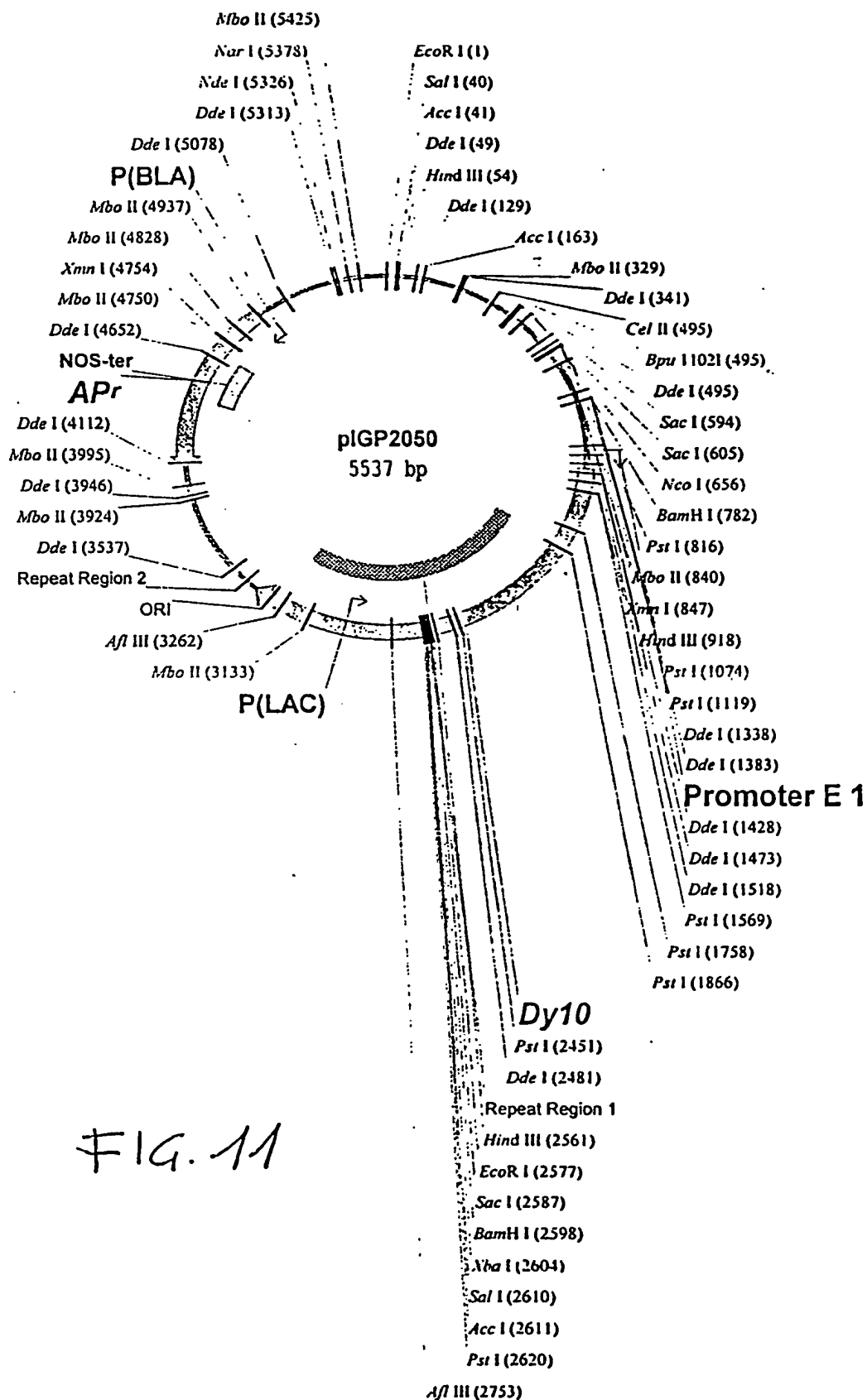


FIG. 11

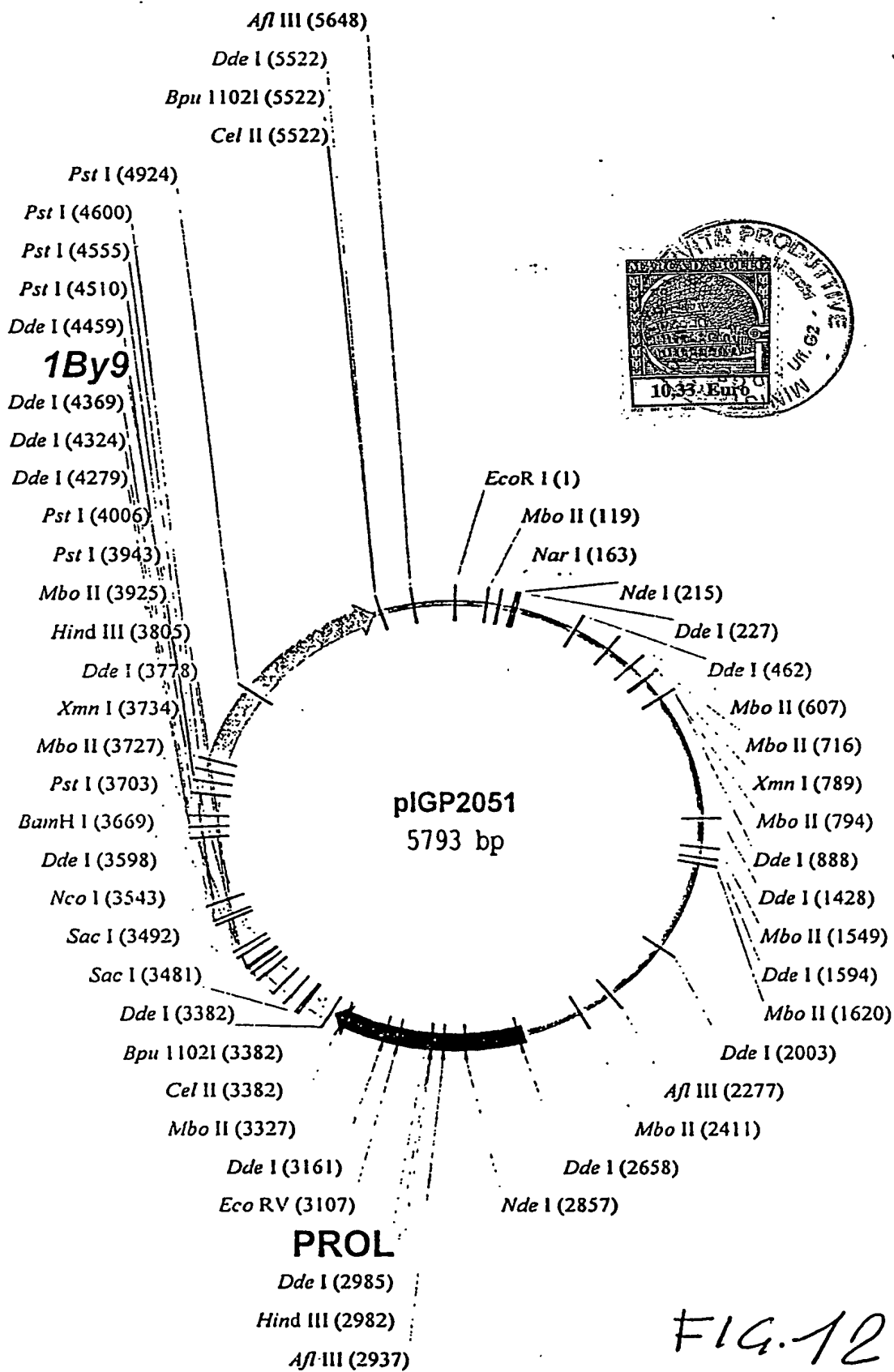


FIG. 12

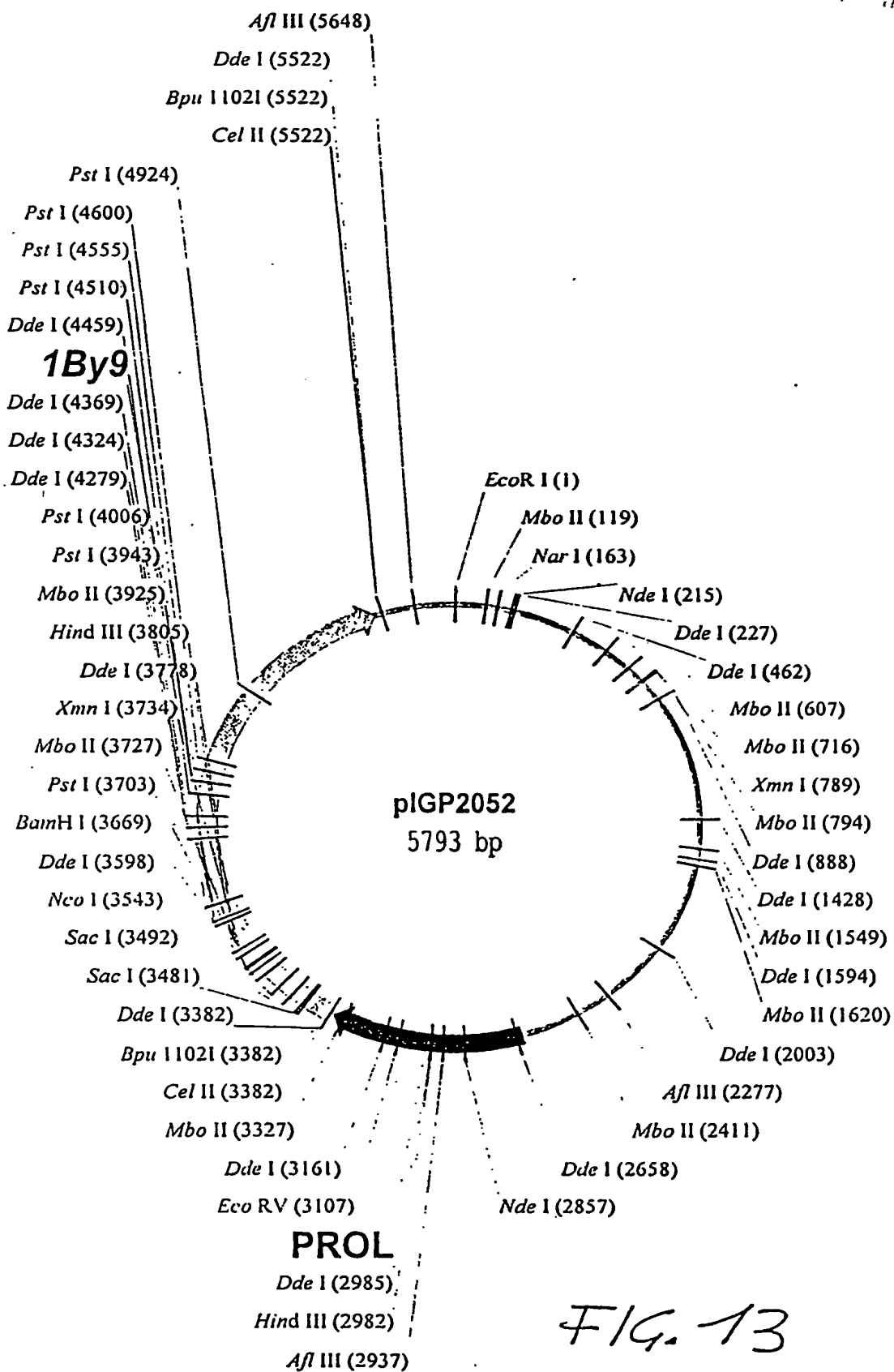


FIG. 13



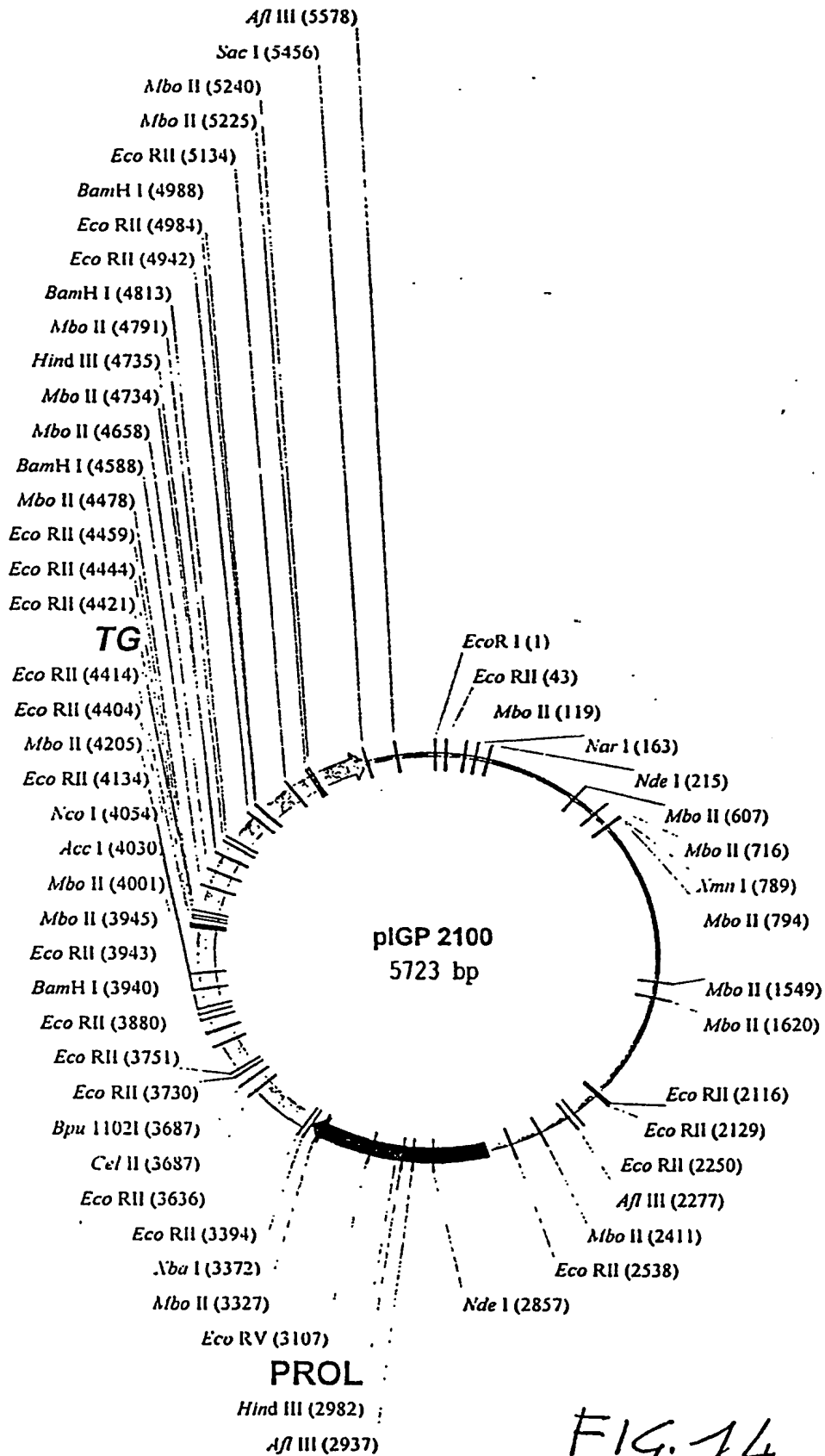


FIG. 14



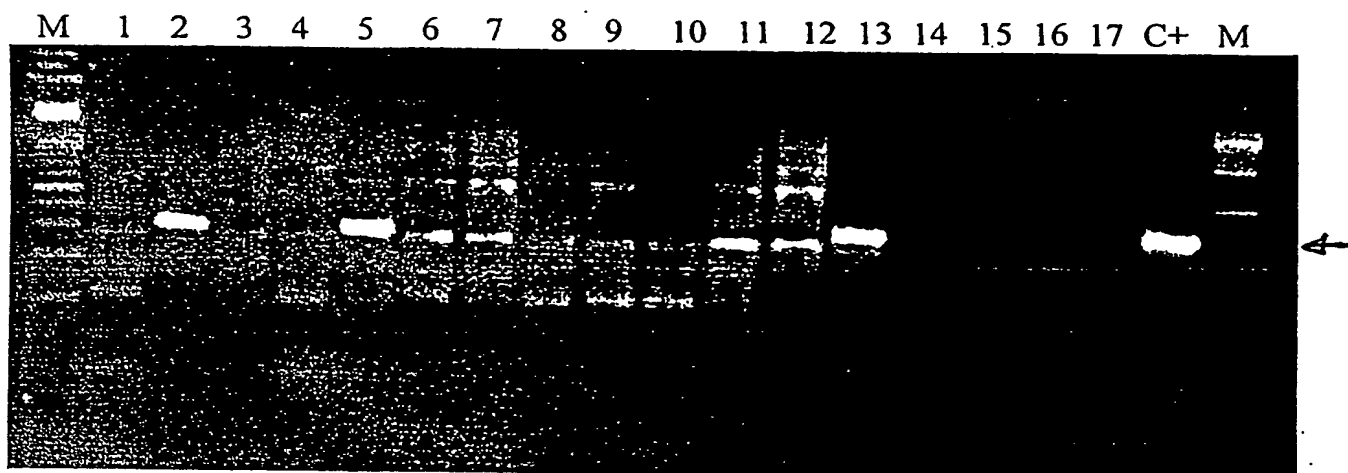


Figura 15. Gel di agarosio colorato con etidio bromuro e fotografato alla luce UV per evidenziare i prodotti di amplificazione ottenuti utilizzando DNA estratto da foglie di linee di riso trasformate con il vettore pIGP2002 e due primer che amplificano un frammento interno al gene di circa 300 pb. M = marcatori di peso molecolare (100 bp ladder (Promega); C+ = controllo positivo (DNA plasmide); 1-16 = singole piante di riso rigenerate su terreno di selezione; 17 = controllo negativo (DNA estratto da una pianta della var. Rosa Marchetti). Le piante positive sono quelle che presentano il frammento indicato dalla freccia.



CAMPUS UNIVERSITA' DI PADOVA
 ANTICAMPUS E AGROLOGIA
 DI PADOVA
 UFFICIO DI RICERCA
 S. ANTONIO

[Handwritten signature]

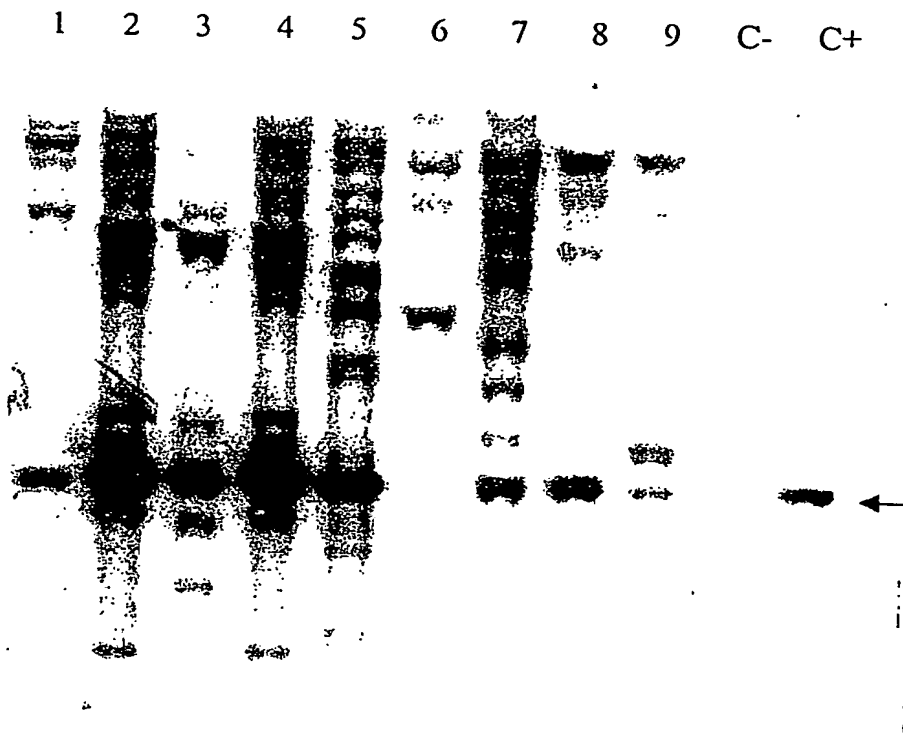


Figura 16. Analisi Southern eseguita utilizzando DNA estratto da linee transgeniche di riso positive alla PCR. Come sonda si è utilizzato un frammento del gene By9, il DNA genomico di riso è stato tagliato con due enzimi in modo da avere una indicazione del numero di copie del gene presenti in ogni linea. 1-9 = linee transgeniche di riso trasformate con il plasmide pPGI2002; C- = controllo negativo (DNA della var. Rosa Marchetti); C+ = controllo positivo.



SECRET

BO2002A 000714

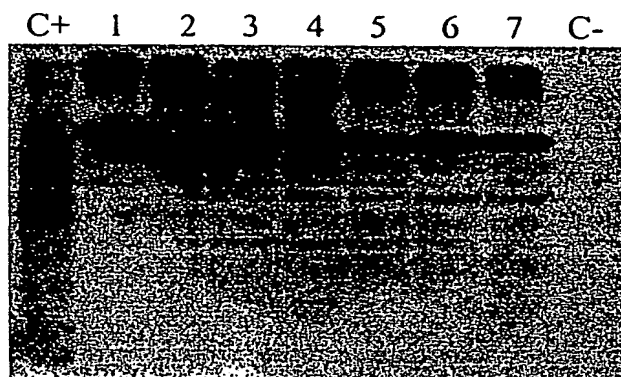


Figura 18. Analisi Western eseguita su proteine totali, estratte da seme di riso transgenico, dopo separazione mediante elettroforesi SDS-PAGE, trasferimento su membrana e rilevazione in chemiluminescenza utilizzando come anticorpo primario un policlonale prodotto in coniglio e specifico della proteina transglutaminasi (TG). 1-7 = proteine totali estratte da seme di alcune linee transgeniche di riso; C+ = controllo positivo (proteina TG prodotta in E. coli); C- = controllo negativo (proteine estratte dalla var. Rosa Marchetti).



CAMERA DI COMMERCIO INDUSTRIA
ARTIGIANATO E AGRICOLTURA
DI BOLOGNA
UFFICIO BREVETTI
IL FUNZIONARIO

A handwritten signature in black ink, located to the right of the official stamp.

BO2002A 000000

W C+ 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 C-

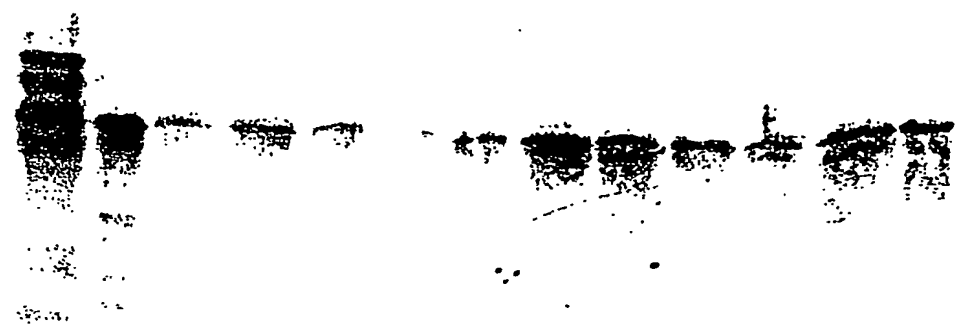


Figura 19. Analisi Western eseguita su proteine totali, estratte da seme di riso transgenico, dopo separazione mediante elettroforesi SDS-PAGE, trasferimento su membrana e rilevazione in chemiluminescenza utilizzando come anticorpo primario un policlonale prodotto in coniglio e specifico della proteina Dy10. W = proteine totali estratte da seme di frumento; 1-11 = proteine totali estratte da seme di diverse linee transgeniche di riso; C+ = controllo positivo (proteina Dy10 prodotta in E. coli); C- = controllo negativo (proteine estratte da seme della var. Rosa Marchetti).



CAMERA DI COMMERCIO, INDUSTRIA
ARTIGIANATO E AGRICOLTURA
DI ROMA
UFFICIO BREVETTI
IL FUNZIONARIO

[Handwritten signature]

BO2002A 000714

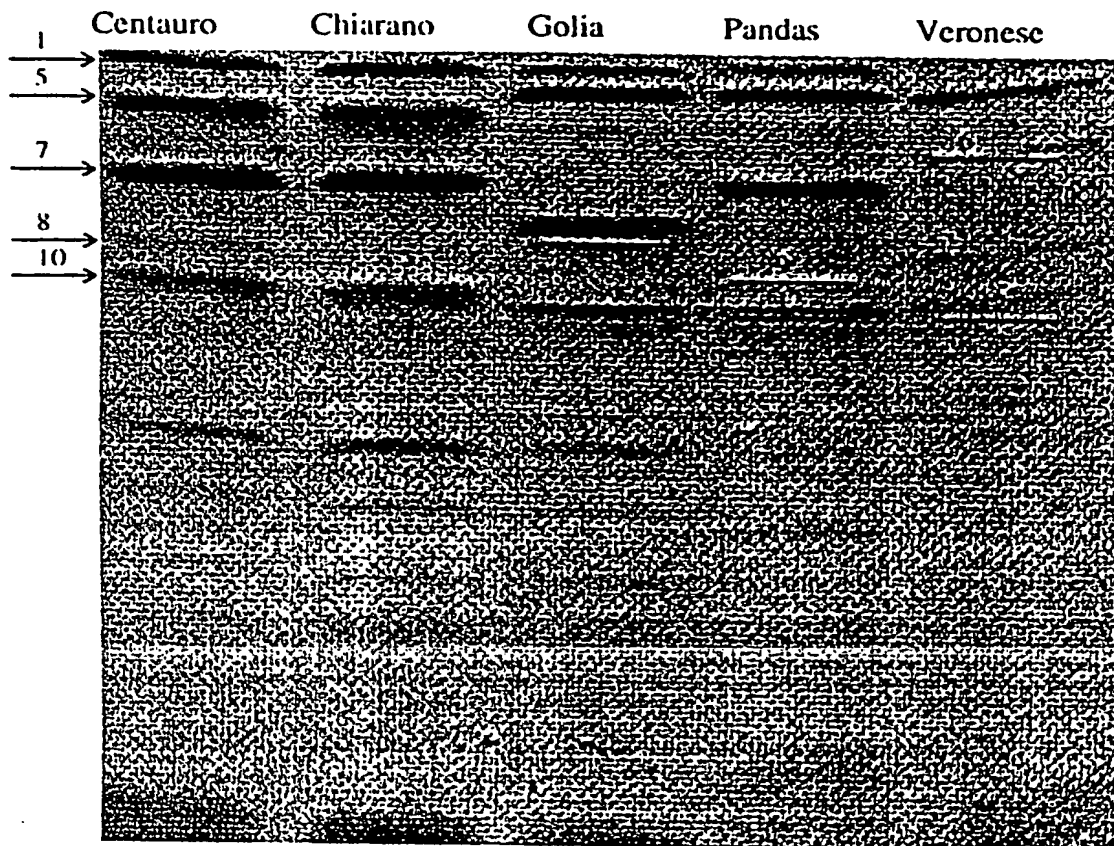
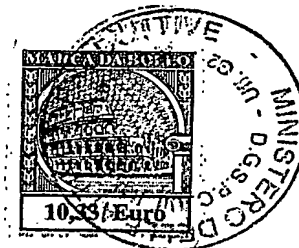


Figura 20. Colorazione con comassie blu di un gel SDS-PAGE per evidenziare le glutenine ad elevato peso molecolare presenti nelle varietà indicate e utilizzate, assieme ad altre varietà, nel lavoro di clonaggio dei singoli geni corrispondenti.



UFFICIO BREVETTI

[Handwritten signature]

B02002A 000714

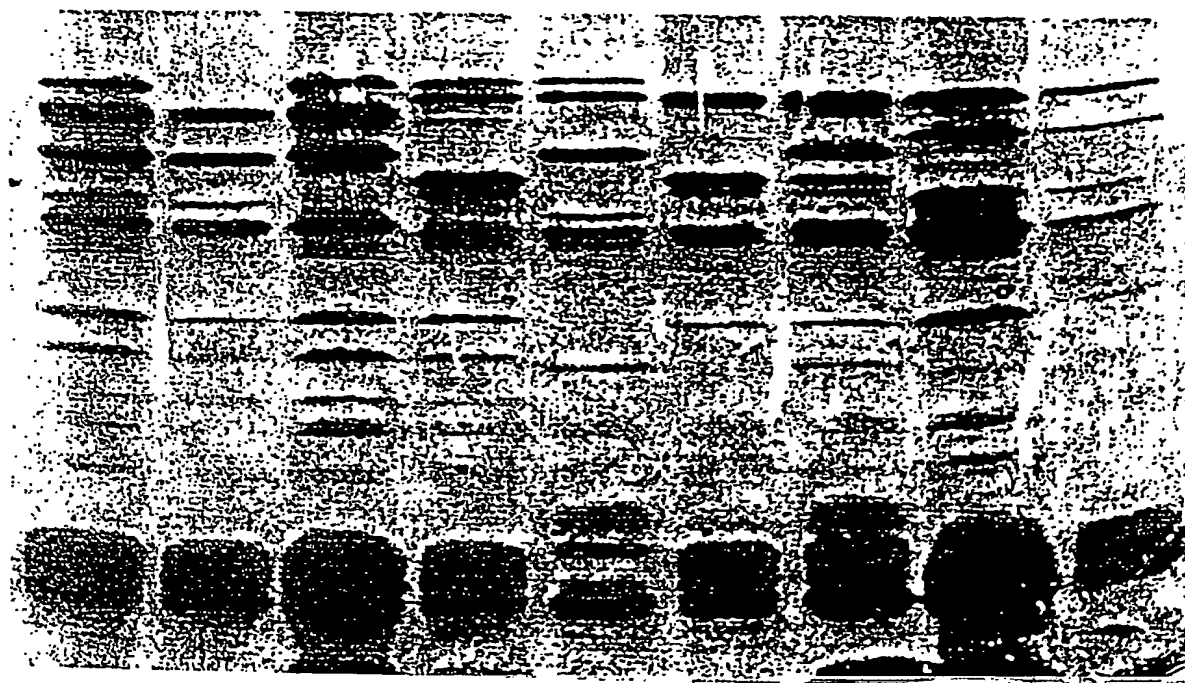


Figura 21. . Colorazione con comassie blu di un gel SDS-PAGE per evidenziare le glutenine ad elevato peso molecolare (parte alta del gel) e le glutenine a basso peso molecolare (parte bassa del gel) presenti in 9 varietà di frumento tenero.



9
B02002A 000714

[Handwritten signature]

BO2002A 000714

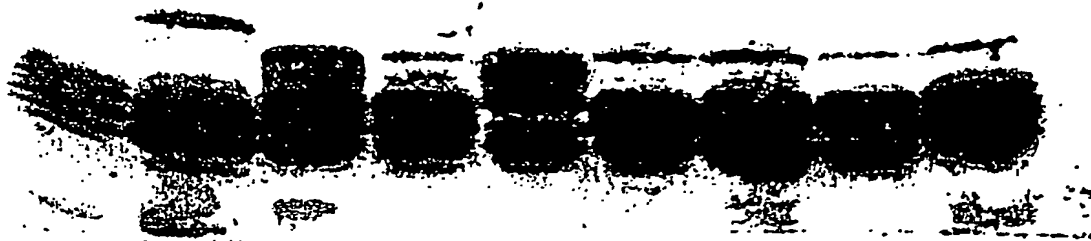


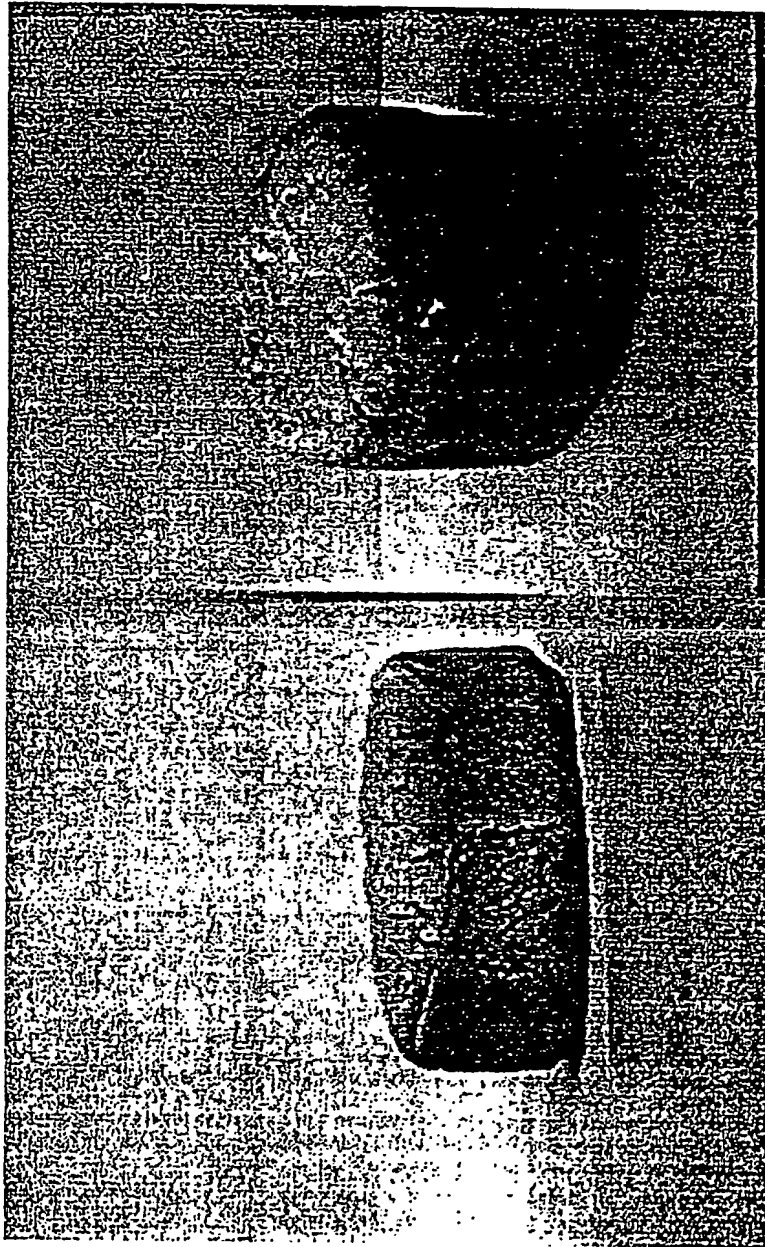
Figura 22. Analisi Western eseguita su proteine totali della figura 21 dopo trasferimento su membrana e rilevazione in chemiluminescenza utilizzando come anticorpo primario le IgA + IgG del siero di un paziente celiaco.



CAMERA DI COMMERCIO INDUSTRIA
ARTIGIANATO E AGRICOLTURA
DI BOLOGNA
UFFICIO BREVETTI
IL FUNZIONARIO

[Handwritten signature]

B02002A 000714



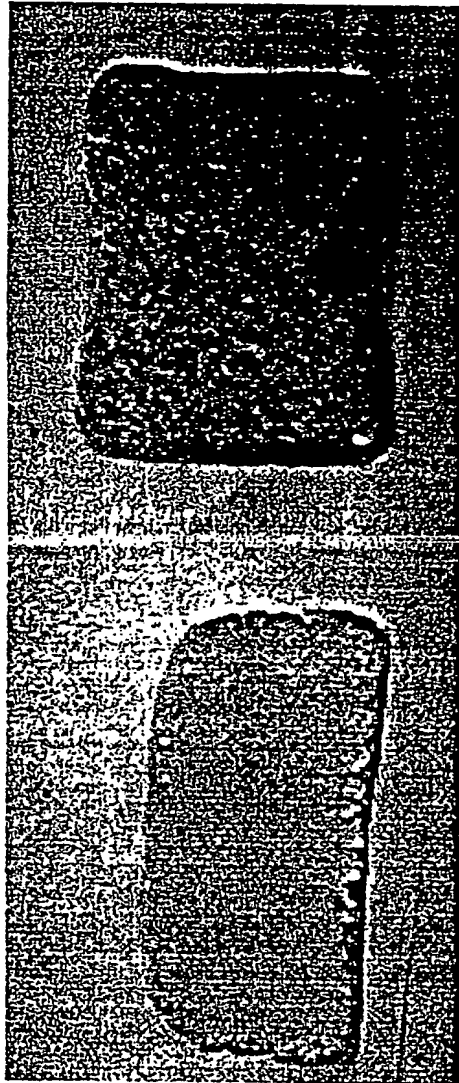
#14.23



MINISTERO DELL'INDUSTRIA
E DELL'AGRICOLTURA
UFFICIO PATENTI
IL FUNZIONARIO

[Handwritten signature]

#15: 24



U.S. DEPARTMENT OF JUSTICE
FEDERAL BUREAU OF INVESTIGATION

[Handwritten signature]

BO2002A 14

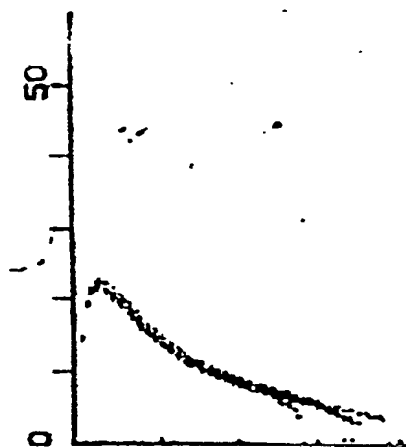


Figura 25. Risultati dell'alveogramma eseguito sull'impasto ottenuto dalla farina della tabella 5. I valori sono $P/L = 0.78 \text{ mmH}_2\text{O/mm}$ e $W = 28 \text{ E-4J}$.



CAMERA DI COMMERCIO INDUSTRIA
ARTIGIANATO E AGRICOLTURA
DI BOLOGNA
UFFICIO BREVETTI
IL FUNZIONARIO

A handwritten signature in black ink, consisting of a series of loops and strokes, positioned to the right of the official stamp.

Controllo Riso PRTG

Primer IGP237 5'-TCTAGAATGGCAGAGGATCTGATCCTGGAG-3'

Primer IGP238 5'-GAGCTCTTAGGCGGGGCCGATGATGACG-3'

Ampl. 2070bp

Gel 0.8% - Marker 1Kb

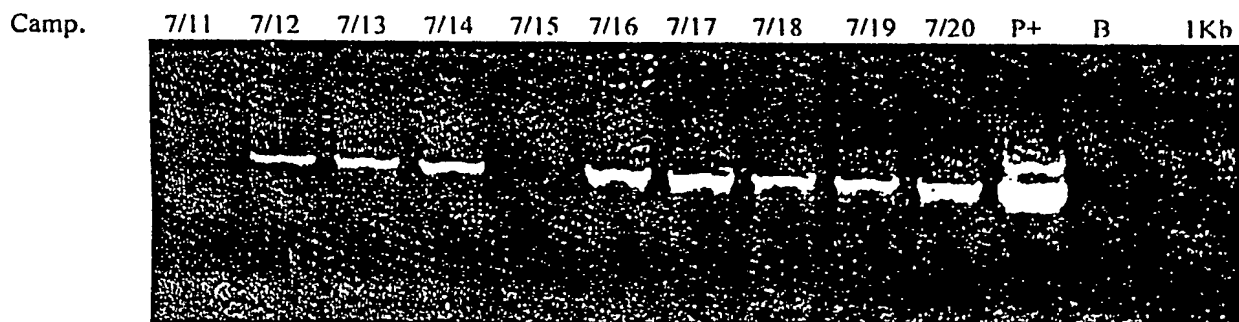
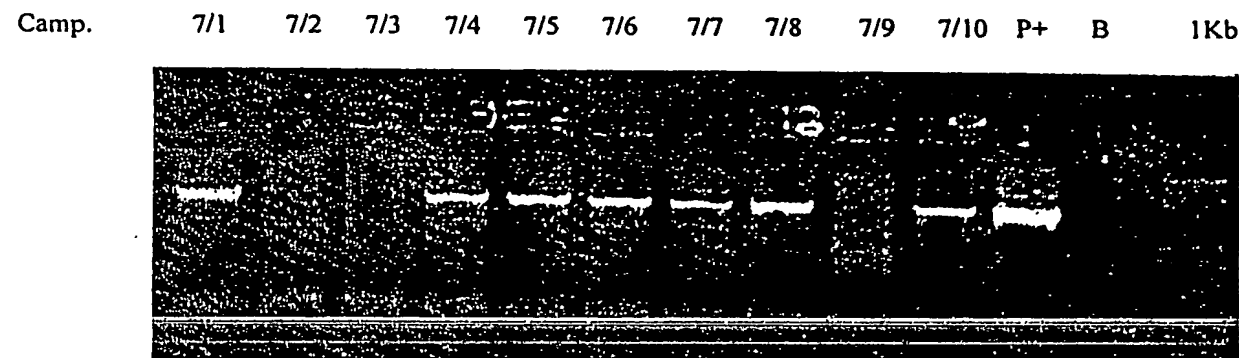
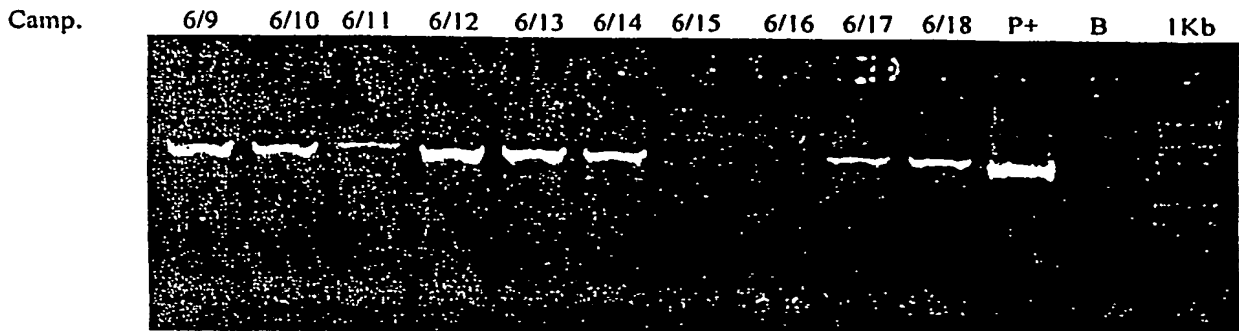


Figura 26. Gel di agarosio colorati con etidio bromuro e fotografati alla luce UV per evidenziare i prodotti di amplificazione ottenuti utilizzando DNA estratto da foglie di linee di riso trasformate con il vettore pIGP2100 e due primer che amplificano il gene di circa 2070 pb. 1kb = marcatori di peso molecolare; P+ = controllo positivo (DNA plasmide); B = controllo negativo (DNA estratto da una pianta della var. Rosa Marchetti). Le piante rappresentano progenie di alcune linee trasformate.



CAMERA DI COMMERCIO INDUSTRIA
AGRICOLTURA E PESCA
BOLOGNA
UFFICIO BREVETTI

[Handwritten signature]

AclI
 AclI
 Asp700
 XmnI
 EcoRI

1 GAATTCCTTC TACATCGGCT TAGGTGTAGC AACACGACTT TATTATTATT
 CTTAAGGAAG ATGTAGCCGA ATCCACATCG TTGTGCTGAA ATAATAATAA

BsmFI

51 ATTATTATTA TTATTATTAT TTTACAAAAA TATAAAATAG ATCAGTCCCT
 TAATAATAAT AATAATAATA AAATGTTTTT ATATTTTATC TAGTCAGGGA

101 CACCACAAGT AGAGCAAGTT GGTGAGTTAT TGTAAGTTTC TACAAAGCTA
 GTGGTGTTC TCTCGTTCAA CCACTCAATA ACATTTCAAG ATGTTTCGAT

Orl

151 ATTTAAAAGT TATTGCATTA ACTTATTTCA TATTACAAAC AAGAGTGTCA
 TAAATTTTCA ATAACGTAAT TGAATAAAGT ATAATGTTTG TTCTCACAGT

NdeI

201 ATGGAACAAT GAAAACCATA TGACATACTA TAATTTTGTT TTTATTATTG
 TACCTTGTTA CTTTTGGTAT ACTGTATGAT ATTAAAACAA AAATAATAAC

AflII

251 AAATTATATA ATTCAAAAGAG AATAAATCCA CATAGCCGTA AAGTTCTACA
 TTTAATATAT TAAGTTTCTC TTATTTAGGT GTATCGGCAT TTCAAGATGT

AflII

HindIII

301 TGTGGTGCAT TACCAAATA TATATAGCTT ACAAACATG ACAAGCTTAG
 ACACCACGTA ATGGTTTTAT ATATATCGAA TGTTTGATC TGTTTCAATC

351 TTTGAAAAT TGCAATCCTT ATCACATTGA CACATAAAGT GAGTGATGAG
 AAACCTTTTA ACGTTAGGAA TAGTGTAAGT GTGTATTTC CTCACTACTC

401 TCATAATATT ATTTTCTTTG CTACCCATCA TGTATATATG ATAGCCACAA
 AGTATTATAA TAAAAGAAAC GATGGGTAGT ACATATATAC TATCGGTGTT

Aha44I

AspHI

BmyI

BsHKA

Bsp1286I

HgiAI

SnaI

ApaLI

MaeIII

EcoRV

451 AGTTACTTTG ATGATGATAT CAAAGAACAT TTTTAGGTGC ACCTAACAGA
 TCAATGAAAC TACTACTATA GTTCTTGTA AAAATCCACG TGGATTGTCT

501 ATATCCAAAT AATATGACTC ACTTAGATCA TAATAGAGCA TCAAGTAAAA
 TATAGGTTTA TTATACTGAG TGAATCTAGT ATTATCTCGT AGTTCATTTT

551 CTAACACTCT AAAGCAACCG ATGGGAAAGC ATCTATAAAT AGACAAGCAC
 GATTGTGAGA TTTCGTTGGC TACCCTTTCG TAGATATTTA TCTGTTTCGT

FokI

601 AATGAAAATC CTCATCATCC TTCACCACAA TTCAAATATT ATAGTTGAAG
 TTACTTTTAG GAGTAGTAGG AAGTGGTGTT AAGTTTATAA TATCAACTTC

TfiI

MboII

651 CATAGTAGTA GAATCCAACA ACAATGAAGA TCATTTTCGT ATTTGCTCTC
 GTATCATCAT CTTAGGTTGT TGTTACTTCT AGTAAAAGCA TAAACGAGAG

Bs-DI

HgaI

MaeI

BlaI

SphI

701 CTTGCTATTG TTGCATGCAA TGCCTCTGCG TCTAGA
 GAACGATAAC AACGTACGTT ACGGAGACGC AGATCT

TAB 3



[Handwritten signature]

B0200000000714

Nome Gene	Acces. Number	Primer senso Primer antisenso	Siti di clonaggio (5'-3')	Dimens. Amplif.
1Ax1	X61009	PLT217-GCTCAGCAGAGTTCTATCACTGGCTGGCCAAC PLT219-GGATCCGATTACGTGGCTTTAGCAGACCGTC	BamHI-PstI	2.783
1Ax2	M22208	PLT228-GGATCCGCTTAGAAGCATTGAGTGGCCGC PLT230-GCTCAGCCTATCACTGGCTGGCCAACAATGC	BamHI-CelII	2.910
1Bx7	M22209	PLT185-TCTAGAATGGCACTACTCGACATGGTTAG PLT186-CACCATGCAAGCTGCAGAGAG	XbaI-PstI	2.853
1Bx17	JC2099	PLT562-TCTAGATATGGCTAAGCGGTTAGTCCTC PLT563-GATATCTGCGAGCTGCAGAGAGTTC	XbaI-SacI	2.259
1By9	X61026	PLT272-CCCGGGCAGATAAATGTTGTGATTCA PLT273-GTCGACTGCAAGTTGCAGAGAGTTCTAT	XbaI-SalI	2.771
1Dx5	X12928	G1B5-TGTTCCATGCAGGCTACCTCCCACTAC PLT189-GTCGACATGCTTAAGCACCATGCGAG	EcoRI-SalI	3.033
1Dy10	X12929	G2B3-AAGCTTTTCATTTTGCAATTATTATTGGGTT G2B5-ACCTTATCCATGCAAGCTACCTTCCAC	EcoRI-EcoRI	2.555
1Dy12	X03041	PLT482-GAATTCGAGATTGCAAAAGCAATGGCTAAC PLT483-TCTAGAGCTTGTGAGAAAGGGTAATCATCAGTG	EcoRI-PstI	3.035
HMW2	X03346	PLT488-GAATTCAGCTTTGAGTGGCCGTAGATTGCA PLT489-GGATCCATATAGGATCTGTGCAATTCATGGCTG	EcoRI-BamHI	3.179
Glu1A	X03042	PLT571-TCTAGATGGCTAAGCGGTTGGTCCTC PLT572-GATATCGCTCCTTGTGCAATTCACACTCTTAC	BamHI-SalI	2.895
TG	M19646	PLT237-TCTAGAATGCCAGAGGATCTGATCCTGGAG PLT238-GAGCTCTTAGCGGGGCGGATGATGACG	XbaI-SacI	2.072

Tabella 4

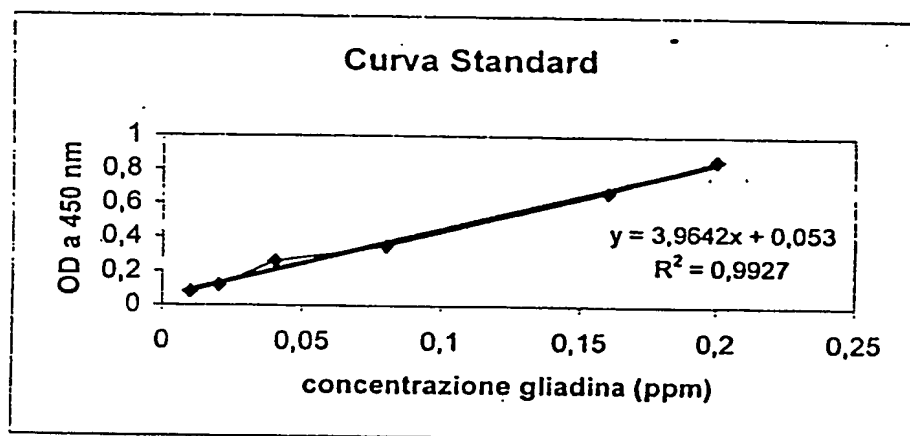


CARTELLI DI COMMERCIO INDUSTRIA
OFFICINA DI AGRICOLTURA
LIVIGNO
UFFICIO BREVETTI
IL FUNZIONARIO

[Handwritten signature]

BO2002A 000714

campione	ppm	OD 450 nm
controllo negativo	0	0,12
STND	0,01	0,08
STND	0,02	0,12
STND	0,04	0,26
STND	0,08	0,35
STND	0,16	0,67
STND	0,2	0,86



campione	OD 450 nm	ppm	diluizione	% glutine
Farina di riso (Reference)	0,13	0,019	1/500	0,002
Nuova Farina	0,15	0,024	1/500	0,002
Farina di frumento	0,49	0,110	1/500000	11,024

% glutine= OD(450)xFx2

F= Fattore di diluizione

2= Fattore di conversione per il glutine totale

Pesata iniziale del campione 5g

TAB. 5



CAMPO DI COLTIVAZIONE INDUSTRIALE
CULTURA DI COLTIVAZIONE
CULTURA DI COLTIVAZIONE
CULTURA DI COLTIVAZIONE
CULTURA DI COLTIVAZIONE

[Handwritten signature]

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☒ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.